



Neuartige Bausteine für die Synthese von Peptid-Nucleinsäuren

Diplomarbeit

von

Sven Thomas Breitung

aus

Frankfurt am Main-Höchst

vorgelegt dem Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

August 2004

**Den Familien
Breitung, Eckermann und Scheff**

**Dein Auge kann die Welt
trüb oder hell Dir machen.
Wie Du sie ansiehst,
wird sie weinen oder lachen.**

Friedrich Rückert

Die vorliegende Diplomarbeit wurde von Januar 2004 bis August 2004 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel möchte ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis, für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit, sowie für die hervorragende Betreuung und zahlreichen Anregungen danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der spektroskopischen Abteilung, ganz besonders bei Herrn Dr. J. G. Zimmermann, für die Messungen der NMR-Spektren bedanken, bei Frau M. Christoph für die Messung der Elementaranalysen, bei Frau I. Prieß und Frau H. Brill für die Anfertigung der Massenspektren.

Bei Herrn Dr. G. Dürner und seiner Mitarbeiterin Frau G. Stracke bedanke ich mich für die HPLC-Trennung.

Frau G. Stracke danke ich für die Bereitstellung von destillierten Lösungsmitteln.

Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Frau Dipl.-Chem. V. Ludwig und Herrn Dipl.-Chem. G. Seifert für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowohl bei synthetischen Fragestellungen als auch bei der Literaturrecherche. Herrn Dipl.-Chem. O. Boden und Herrn Dr. A. Krebs danke ich für ihre permanente Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Außerdem geht ein besonderer Dank an Herrn Dipl.-Chem. O. Boden, Herrn Dipl.-Finanzwirt Karl Breitung, Herrn Dipl.-Chem. M. Suhartono und Herrn Dr. A. Krebs für das kritische Korrekturlesen und die wertvollen Anregungen beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreis für die sehr gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, namentlich Frau M. Funke, Herrn Dipl.-Chem. C. Gnaccarini, Herrn Dipl.-Chem. M. Hey, Frau E. Kalden, Herrn Dipl.-Chem. Z. Nazir, Herrn Dipl.-Chem. S. Peter, Herrn Dr. C. Roussev, Frau T. Ruppenthal, Frau Dr. U. Scheffer, Herrn Dipl.-Chem. A. Spielmann, Frau N. Tatarovic, Herrn Dipl.-Chem. C. Timm, Herrn S. Ullrich, Herrn H. Walther und Herrn Dipl.-Chem. M. Weimar.

Einen herzlichen Dank an alle meine Freunde möchte ich nicht vergessen, dass sie während dieser Zeit auf mich Rücksicht genommen und mir hilfsbereit zur Seite gestanden haben.

Ganz besonders möchte ich mich dabei bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium erst in diesem Rahmen ermöglicht haben und immer als Ansprechpartner zur Verfügung standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Miriam, dass sie mich die ganze Zeit liebevoll unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Polyamid (Peptid) Nucleinsäure (PNA)	5
2.1	Monomere Bausteine für die PNA Synthese	6
2.1.1	Monomere PNA-Bausteine mit einem Aminoethylglycin- Rückgrat.....	6
2.2	Synthese der Nucleobasenessigsäurederivate.....	7
2.3	Monomere mit säurelabiler N-Schutzgruppe.....	8
2.4	Monomere mit basenlabiler N-Schutzgruppe.....	10
2.5	Monomere PNA-Bausteine mit modifiziertem Rückgrat.....	11
2.5.1	Monomere mit achiralem Rückgrat.....	11
2.5.2	Monomere mit einem chiralen oder olefinischen Rückgrat.....	13
2.6	PNA-Oligomer-Synthese.....	14
2.7	Chemische und physikalische Eigenschaften von PNA.....	16
2.7.1	Chemische Stabilität.....	16
2.7.2	Löslichkeit.....	17
2.8	Bindungsaffinitäten.....	17
2.8.1	Duplexformation mit komplementärer DNA und RNA.....	18
2.8.2	Bildung von Tripelhelices.....	19
2.9	Strangverdrängung.....	21
2.10	Struktur von PNA*DNA-Duplexen.....	22
2.11	Struktur von PNA*DNA-Duplexen.....	23
2.12	Struktur von (PNA) ₂ *DNA-Tripelhelices.....	23
2.13	Biologische Eigenschaften von PNAs.....	24
2.13.1	Stabilität in biologischen Systemen.....	24
2.13.2	Zelluläre Aufnahme von PNAs.....	25
2.14	Inhibition der Genexpression.....	26
2.14.1	Inhibition der Translation.....	26
2.14.2	Inhibierung der Transkription.....	26
2.15	PNA-Oligomere als Inhibitoren des Tat/TAR-Komplexes.....	27
3	Biologischer Hintergrund	30
3.1	RNA-Struktur.....	30
3.2	RNA-Ligand-Wechselwirkung.....	34

3.2.1	Nicht-spezifische RNA-Ligand-Wechselwirkungen.....	35
3.2.2	Aminoglycoside.....	37
3.2.3	Liganden für die TAR-RNA.....	37
3.3	Tat/TAR-Komplex.....	41
3.4	Biologische Funktion der RNA.....	42
3.5	Lebenscyclus des human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).....	43
4	Methoden zur Quantifizierung von Komplexstabilitäten von RNA-Liganden.....	45
4.1	Methoden über radioaktiver Markierung.....	45
4.2	Elektronen paramagnetische Resonanzspektroskopie (EPR).....	45
4.3	Fluoreszenzspektroskopie/FRET.....	46
5	Festphasenpeptidsynthese.....	49
5.1	Gegenüberstellung Boc- und Fmoc-Strategie.....	50
5.2	Harze für die Festphasenpeptidsynthese.....	50
5.3.	Kupplungsmethoden.....	51
5.4	Lösungsmittel.....	53
5.5	Abspaltung vom Harz und Entschützung.....	53
6	Eigene synthetische Arbeiten.....	55
6.1	Versuch zum Aufbau eines neuartigen Grundgerüsts.....	55
6.2	Synthese des 6-Aminochinolin-2(1H)-on.....	61
6.3	Synthese des 6-Aminochinolin-2(1H)-on essigsäurederivats.....	63
6.4	Synthese des PNA-Monomers.....	64
6.5	Synthese des PNA-Grundgerüsts.....	66
6.6	Synthese zum Iminochinolin.....	67
6.7	Synthese von Tripeptiden.....	68
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	71
7.1	Synthese des PNA-Bausteins.....	71
7.2	Synthese des PNA-Monomers.....	72
7.3	Alternative Methoden.....	72
7.4	Ausblick.....	73
8	Experimenteller Teil.....	75
8.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen.....	75
8.2	Darstellung von (E)-3-Ethoxy-2-propenoylchlorid (83).....	78
8.3	Darstellung von N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (86).....	79

8.4	Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1 <i>H</i>)-on (3).....	80
	Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1 <i>H</i>)-on Pikrat (3a).....	80
	Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1 <i>H</i>)-on Hydrochlorid (3b).....	80
8.5	Darstellung von 6-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylmethylamino)chinolin-2-(1 <i>H</i>)-on (87).....	81
8.6	Darstellung von 6-(Carboxymethylamino)chinolin-2-(1 <i>H</i>)-on-Dihydrochlorid (4).....	82
8.7	Darstellung von 6-[Carboxymethyl-(<i>tert</i> -Butylcarbonyl)-amino]-chinolin-2-(1 <i>H</i>)-on (96).....	83
8.8	Darstellung von N-(2-Aminoethyl)glycin (71).....	84
8.9	Darstellung von 2-(Brom-ethyl)-carbaminsäure-9 <i>H</i> -fluoren-9-yl-methylester (73).....	85
8.10	Darstellung von N-(2-Aminoethyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester (61)	86
8.11	Darstellung von N-(2-[<i>tert</i> -Butoxycarbonylaminoethyl]-nitrilodiessigsäureallylester (76).....	87
8.12	Darstellung von N-(2-[<i>tert</i> -Butoxycarbonylaminoethyl]-nitrilodiessigsäure (77).....	88
8.13	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl N-(2-aminoethyl)-glycinat (89).....	89
8.14	Darstellung von <i>tert</i> -Butyl N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)amino-ethyl]-glycinat Hydrochlorid (5).....	90
8.15	Darstellung von [2-(2-Chloroacetyl-amino)-ethyl]-carbaminsäure- <i>tert</i> -Butylester (68).....	91
8.16	Darstellung von Allylbromacetat (65).....	92
8.17	Darstellung von {[2-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-[2-(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylamino)-acetyl]-amino}-essigsäure <i>tert</i> -butylester (6).....	93
8.18	Darstellung von 6-Amino-2-chloro-chinolin (90).....	94
	Darstellung von 6-Amino-2-chloro-chinolin Pikrat (90a).....	94
8.19	Darstellung von N-{(2-[<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino]ethyl)-[(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylcarbonyl)-methyl]-nitrilo}-essigsäure (10).....	96
8.20	Darstellung von (4)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH ₂ (95).....	97

9	Anhang	99
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	99
9.2	Literaturverzeichnis.....	101
9.3	Eidesstattliche Erklärung.....	105

1 Einleitung

Die voranschreitende Aufklärung der Wirkungsweise von nichtkodierenden und strukturell aufgeklärten RNAs, die andere funktionelle Rollen haben als codierende mRNA-Sequenzen, führte zur Erkenntnis, dass RNA eine Schlüsselstellung in zellulären Prozessen innehat. Dies zeigt sich auch in Ribonucleoproteinen, in denen die RNA permanent oder vorübergehend mit Proteinen Wechselwirkungen eingeht. Kleine Moleküle kommen in der Natur beispielsweise als antibiotische Sekundärmetabolite von Pilzen oder Bakterien vor, die zelluläre Prozesse verändern oder inhibieren können. Dies geschieht zum Großteil durch spezifische Wechselwirkungen mit den RNA-Komponenten der Ribonucleoprotein-Komplexen. Ein Beispiel für die Wechselwirkung von kleinen Molekülen und RNA ist das bakterielle Ribosom, das Ziel verschiedener natürlicher Antibiotika wie Aminoglycoside, die an die ribosomale RNA (rRNA) binden und damit die bakterielle Proteinsynthese stören. Die Erkenntnis, dass rRNA das primäre Ziel für viele Ribosom-gerichtete Antibiotika ist, und dass einige Antibiotika spezifisch virale RNA Strukturen erkennen, erregte das Interesse an RNA als „drug target“. Obwohl die Wissenschaft bei der Entdeckung von neuen kleinen Molekülen, die als RNA-Ligand wirken könnten, im Vergleich zu den Arbeiten des Arzneimitteldesigns gegen Proteine und Enzyme noch in den Kinderschuhen steckt, gibt es beachtliche Anstrengungen zum Design, Synthese und Screening von möglichen RNA-Liganden.^[1] RNA bietet dahingehend verschiedene selektive Vorteile gegenüber der DNA. RNA ist im Gegensatz zur gepackten DNA in Chromosomen zugänglicher für Wechselwirkungen mit Liganden. Ein weiterer wichtiger Punkt sind die Reparaturmechanismen der DNA, die bei der RNA nicht bekannt sind und die ausgeprägte Tertiärstruktur der RNA, die ein größeres Potential für selektive Wechselwirkungen mit Liganden ermöglicht.^[2]

Im Zusammenhang mit der Erforschung des HIV-1, dem Erreger der AIDS-Krankheit, wurde auf der viralen RNA die *trans*-aktivierende Region (TAR) entdeckt, die mit dem Tat-Protein, einem essenziellen Virus-Protein, in Wechselwirkung tritt und dadurch die Transkription anregt. Durch Blockierung der Tat/TAR-Wechselwirkung wird die virale Transkription und somit die Replikation des Virus inhibiert.^[3]

Acquired Immune deficiency syndrome (AIDS) erreicht Ausmaße einer weltweiten Epidemie, nicht zu vergessen die enormen Anstrengungen für die Prävention von AIDS. Zurzeit wird die klinische Behandlung von AIDS-Patienten über HAART (highly active antiretroviral therapy)

durchgeführt, eine Kombination von Medikamenten, die auf die zwei Schlüsselenzyme der HIV-1 reverse Transkriptase und Protease abzielen.

HAART ist nach einer 1998 durchgeführten Studie des Centers for Disease Control and Prevention der USA erfolgreich bei der Reduzierung der Virusmenge. Größtes Hindernis einer erfolgreichen HIV-1 Therapie ist die rapide Entstehung von medikamentenresistenten Retrovirenstämmen durch Mutation, die Hartnäckigkeit von integrierten Proviren in der Wirtszelle und die Vielzahl an latenten infizierten Zellen.^[4]

Williamson *et al.*^[5] konnten zeigen, dass die Wechselwirkung des RNA-Liganden Argininamid mit der RNA (siehe Abbildung 1) sich durch deutliche Strukturänderungen bemerkbar macht.

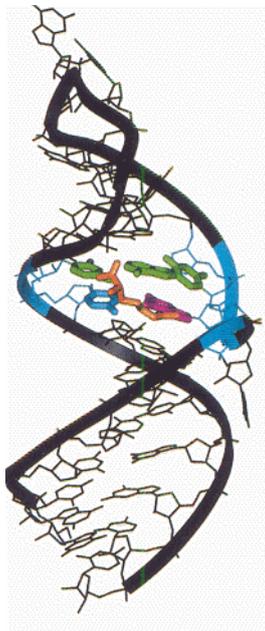


Abbildung 1: Sekundärstruktur von TAR-RNA–Argininamid-Komplex

V. N. Pandey *et al.*^[6] fanden heraus, dass eine komplementäre Peptid-Nucleinsäure (PNA) zur TAR-Sequenz des viralen Genoms die Ausbildung des Tat/TAR-Komplexes inhibiert, da die komplementäre PNA eine höhere Affinität zur TAR-RNA als das Tat-Protein besitzt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Derivate des Chinolins (**1**) dargestellt, die als RNA-Ligand durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an der großen Furche binden sollen.

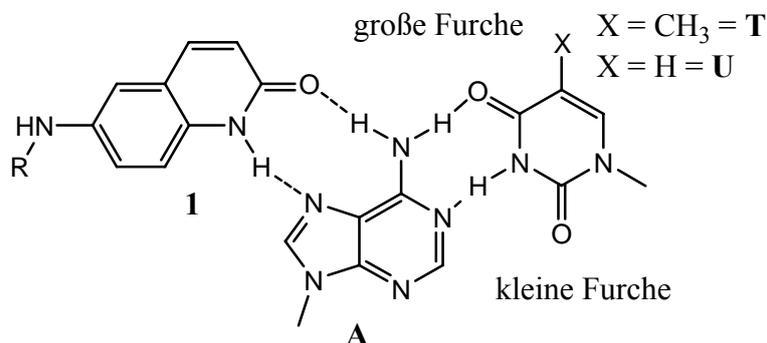
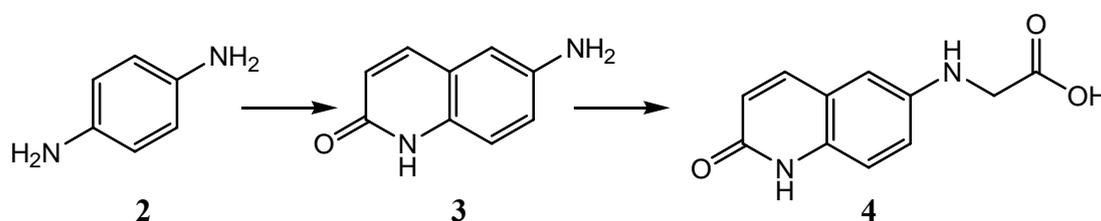


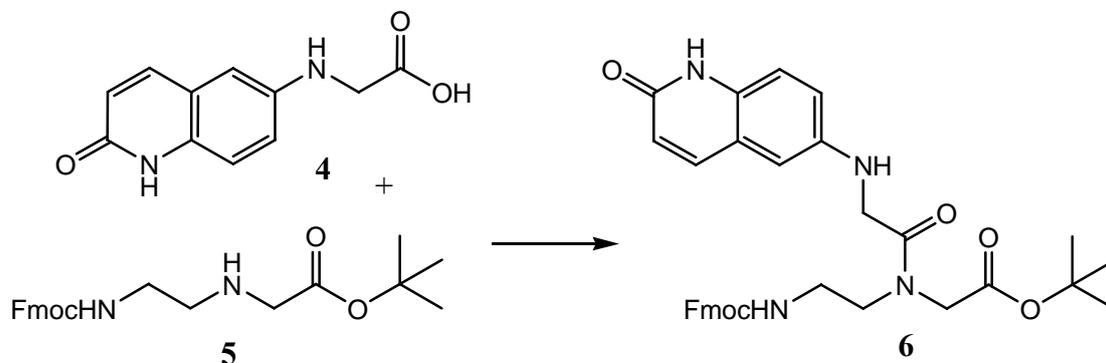
Abbildung 2: Basen-Triplett Chinolin (**1**) A(T/U)

Das primäre Ziel der Arbeit war die Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1H)-on (**3**) und dessen Kupplung durch ein Essigsäurederivat (**4**) an ein PNA-Grundgerüst (**5**), welches als Monomer in eine Tripeptidsequenz eingebaut werden sollte. Das Tripeptid soll daraufhin auf seine Eigenschaft als RNA-Ligand untersucht werden.

Zur Darstellung des Chinolins (**3**) wurde ein Weg analoge zur Darstellung von 6-Bromochinolin-2(1H)-on^[7] ausgehend von *para*-Phenylendiamin (**2**) gewählt.

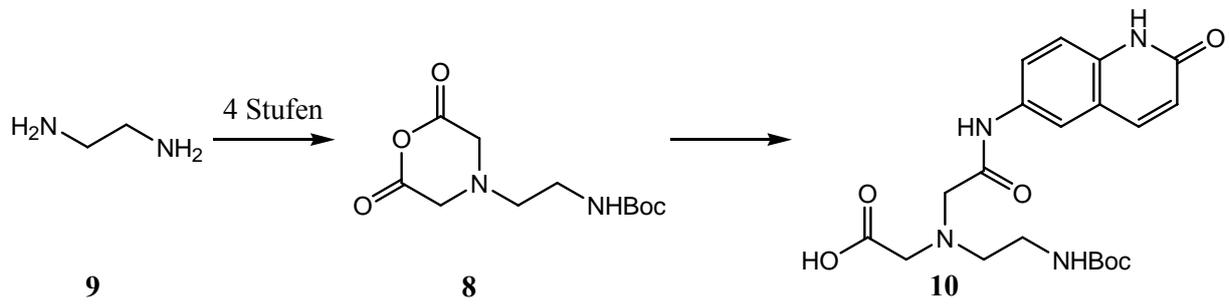


Durch weitere zwei Reaktionen wurde das Essigsäurederivat (**4**) erhalten, das an das PNA-Grundgerüst gekuppelt wurde.



Ein weiteres Grundgerüst wurde entwickelt, an das Moleküle mit Aminogruppen gekuppelt werden können. Das Anhydrid (**8**) konnte ausgehend von Ethylendiamin (**9**) auf zwei

verschiedenen Wegen dargestellt werden. Durch Reaktion mit dem Chinolin (**3**) konnte das Amid (**10**) synthetisiert werden.



2 Polyamid (Peptid) Nucleinsäure (PNA)

Eines der wichtigsten Beispiele von molekularer Erkennung ist die Basenpaarung von Nucleinsäuren (NA), die die Lagerung, den Transfer und die Expression von genetischen Informationen im lebenden System gewährleisten. Zur Entwicklung von neuen DNA-Diagnostika und Oligonucleotid-Therapeutika gab es in den letzten Jahren Versuche, die Eigenschaften der Oligonucleotide zu optimieren. Dabei kam es zu Modifikationen an der Phosphatgruppe, der Ribose oder den Nucleobasen.^[8] Die wohl radikalste Veränderung des von der Natur vorgegebenen Grundgerüsts erfolgte in der dänischen Gruppe von P. E. Nielsen durch die Entwicklung der Polyamid (Peptid) Nucleinsäure (PNA).^[9] PNA ist ein den Nucleinsäuren ähnliches Makromolekül, das mit den NA hybridisieren kann. Dies ist möglich, da die normalerweise eingesetzten PNA die gleichen Nucleobasen wie die NA enthalten und diese im gleichen Abstand und in ähnlicher Winkelgeometrie an das Grundgerüst anknüpfen. Diese hybridischen PNA/NA-Doppelhelices weisen sogar eine höhere Stabilität auf als die Hybride der Desoxyribonucleinsäuren (DNA) und Ribonucleinsäuren (RNA).

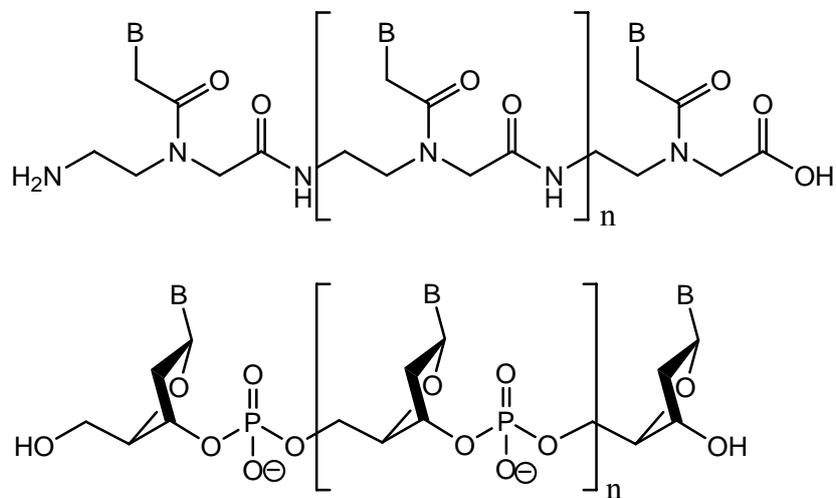


Abbildung 3: Struktur von PNA im Vergleich zu DNA

Statt eines Zucker-Phosphat-Grundgerüsts weist die PNA ein Peptid-ähnliches Polymerisat aus Aminoethylglycin auf. Die Synthese der PNA erfolgt nach ähnlichen Prinzipien, die aus der Peptid-Synthese bekannt sind. Anwendung findet die PNA z.B. als ein Nuclease-stabiles Antisense-Oligomer, als Sonden bei der Isolierung von DNA-Sequenzen oder potenziell als Anti-Krebs-Mittel.^[10] Im folgenden Kapitel wird auf die Synthese, die Eigenschaften und die möglichen Anwendungen von PNAs besonders eingegangen. Bei PNA/DNA Chimeren, Kombinationen aus PNA und NA wird auf die Literatur verwiesen.^[11]

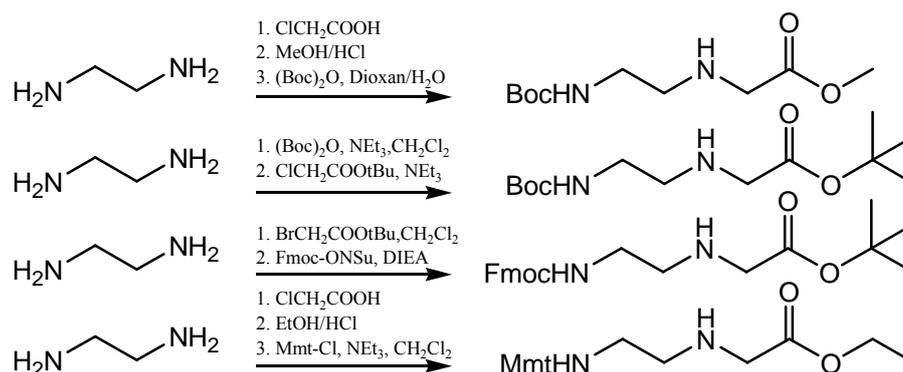
2.1 Monomere Bausteine für die PNA Synthese

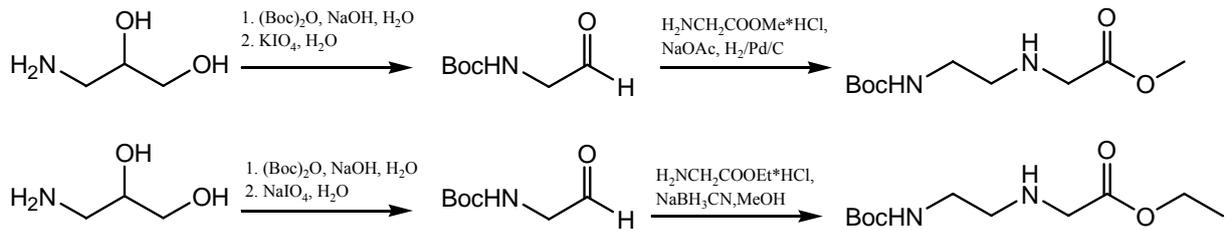
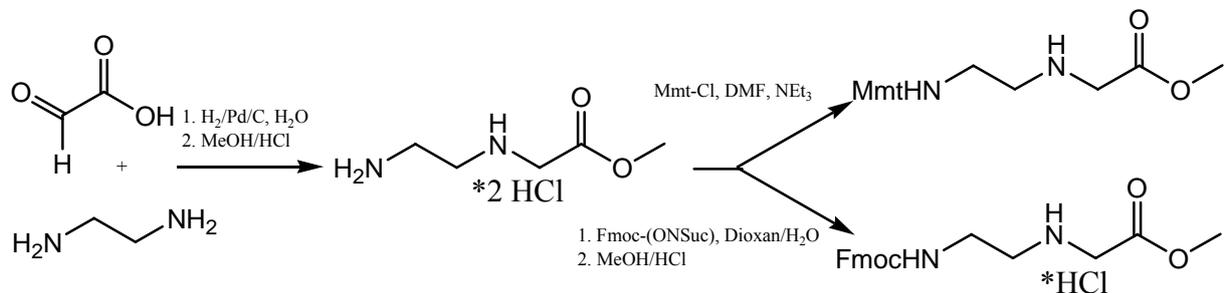
Eine Bandbreite an verschiedenen monomeren Bausteinen wurde für Synthesen von PNA und deren Analoga verwendet. Diese Bausteine unterscheiden sich durch die verwendete Schutzgruppe der Amino-Gruppe des Bausteins bzw. über die Nucleobase und über die allgemeine Struktur des Grundgerüsts. Außer dem normalerweise vorliegenden Grundgerüst eines N-(2-Aminoethyl)glycins finden auch andere achirale und chirale Grundbausteine ihre Anwendung. Im Folgenden sollen die Strukturen der wichtigsten monomeren Grundbausteine und deren Synthese vorgestellt werden.^[8]

2.1.1 Monomere PNA-Bausteine mit einem Aminoethylglycin-Rückgrat

Die frühesten PNA-Bausteine bestehen aus der Aminosäure N-(2-Aminoethyl)glycin, wobei das sekundäre Amin acyliert mit einem Derivat der Nucleobasenessigsäure vorliegt. Säure- und baselabile Schutzgruppen wurden dabei normalerweise für die temporäre Schützung des primären Amins verwendet. Die Darstellung der Monomere führt auf zwei Wegen zum Ziel: Zuerst die Synthese eines brauchbar geschützten N-Aminoethylglycins und des Weiteren die Darstellung eines Derivats der Nucleobasenessigsäure. Die folgenden Abbildungen zeigen die drei wichtigsten Darstellungsverfahren zu Aminoethylglycin:

1. Alkylierung von Ethylendiamin mit Derivaten der Halogenessigsäure.^[12]



2. Reduktive Aminierung mit Glycinerster und geschützten Aminoacetaldehyden:^[13]3. Reduktive Aminierung mit Ethylendiamin und Glyoxylsäure:^[14]**2.2 Synthese der Nucleobasenessigsäurederivate**

An das ungeschützte sekundäre Amin des synthetisierten Aminoethylglycinderivats können nun Nucleobasenessigsäurederivate gekuppelt werden. Die Synthese der Nucleobasenessigsäurederivate soll nur am Beispiel der Thyminylessigsäure verdeutlicht werden, da dieses System auch Einfluss auf die eigenen synthetischen Arbeiten fand.^[15] Die Thyminylessigsäure benötigt keine zusätzliche Schützung der Base, da kein primäres Amin vorhanden ist, und kann entweder aus der Alkylierung des Thymins mit Halogenessigsäureestern und anschließender Verseifung oder durch direkte Alkylierung mit Bromessigsäure dargestellt werden.

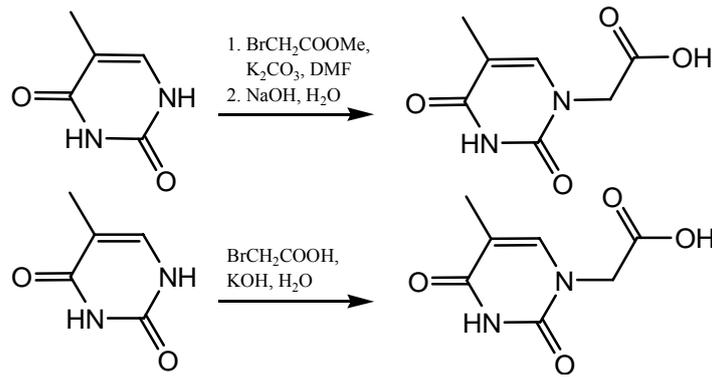


Abbildung 4: Synthese von Thyminessigsäure

2.3 Monomere mit säurelabiler N-Schutzgruppe

Bei der ersten veröffentlichten Synthese von PNA wurden Monomere benutzt, die die Trifluoressigsäure-labile Boc-Schutzgruppe am N-Terminus trugen. Die *exo*-cyclischen Funktionsgruppen der Nucleobase wurden durch Cbz- und/oder Benzylgruppen geschützt, die durch die Zugabe von flüssiger Fluorwasserstoffsäure oder durch Trifluormethansulfonsäure abgespalten werden können.^[16]

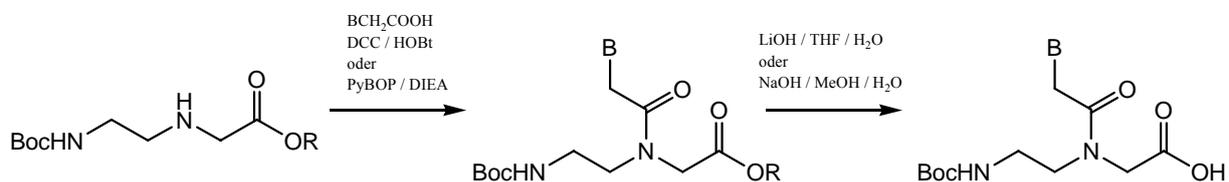


Abbildung 5: Synthese des Boc-geschützten PNA-Monomers

Standardmäßige Kupplungsreagenzien der Peptid-Synthese wie DCC/HOBt oder PyBOP[®] wurden für die Kupplung des Nucleobasenessigsäurederivats mit dem sekundären Amin des Boc-geschützten Aminoethylglycineesters verwendet. Ungeeignet sind diese Bausteine für die Synthese von PNA/DNA-Chimeren, da es unter den stark sauren Bedingungen (TFA/HF), die für eine Entschützung des Monomers notwendig wären, zur Depurination des DNA-Teils des Oligomers kommen würde. Da Mmt-geschützte Monomere unter milden Bedingungen (Trichloressigsäure) abgespalten werden, kommen sie bei der Synthese von Oligomeren wie PNA/DNA-Chimeren zur Anwendung.

Im Allgemeinen wurde durch den Einsatz von basenlabilen Schutzgruppen an den *exo*-cyclischen Aminogruppen der Nucleobasen Adenin, Cytosin und Guanin Kompatibilität mit Standard Oligonucleotidsynthesen gesucht.^[8]

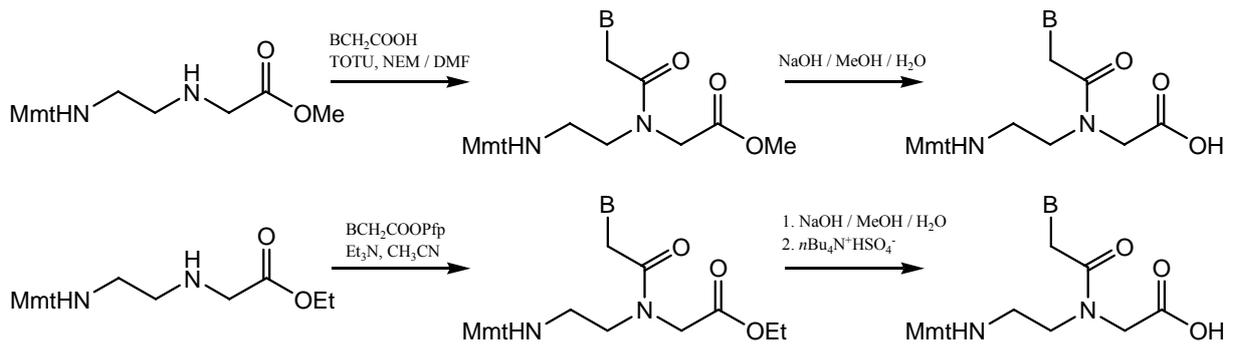


Abbildung 6: Synthese des Mmt-geschützten PNA-Monomers

Um die Nucleobasensignatursäure an das Mmt-geschützte Monomer zu koppeln, wird TOTU als Kupplungsreagenz verwendet. Die Synthese des Monomers wird wiederum durch eine Verseifung des Methylesters mit Natriumhydroxid in einem Wasser/Dioxan-Gemisch beendet.^[10]

Stetsenko *et al.*^[13] koppeln Thymidin- und Uracilsignatursäure an das PNA-Grundgerüst durch deren Pentafluorphenylaktivierte Ester (siehe Abbildung 6). Nach anschließender Verseifung des Ethylesters wurde das Monomer in das Tetrabutylammoniumsalz umgesalzen.

E. Uhlmann *et al.* zeigten einen alternativen Weg, eine Acylierung des Mmt-geschützten Grundgerüsts mit Chloracetylchlorid in THF, wobei das Mmt-geschützte PNA-Grundgerüst zum Chloracetylderivat umgesetzt wird (siehe Abbildung 7).^[17] Durch Lösungsmittelwechsel von THF zu DMF kann dabei das Thymin direkt acetyliert werden.

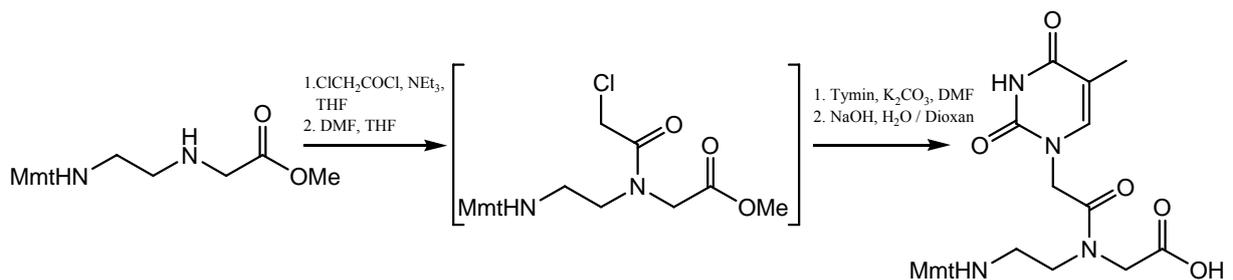


Abbildung 7: Alternative Synthese des Mmt-geschützten PNA-Monomers

Van der Laan *et al.*^[18] und Finn *et al.*^[19] entwickelten eine Methode, wie das Mmt-geschützte PNA-Monomer durch einen Schutzgruppentausch zum Boc-geschützten PNA-Monomer umgesetzt wird.

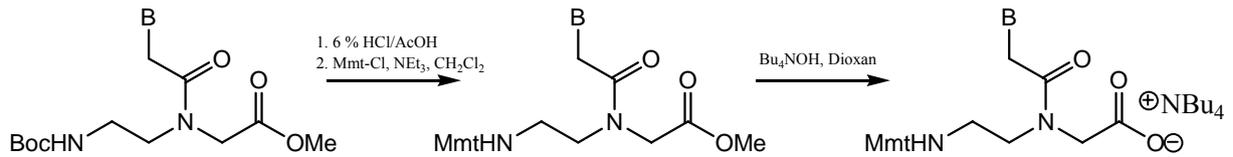


Abbildung 8: Synthese des Mmt-geschützten PNA-Monomers aus dem jeweiligen Boc-geschützten.

E. Uhlmann et al.^[14] veröffentlichten ebenfalls eine Syntheseroute, die es ermöglicht, ein Mmt-geschütztes PNA-Grundgerüst zu synthetisieren, wo vollkommen auf chromatographische Aufreinigung verzichtet werden kann und das Produkt schließlich rein auskristallisiert.

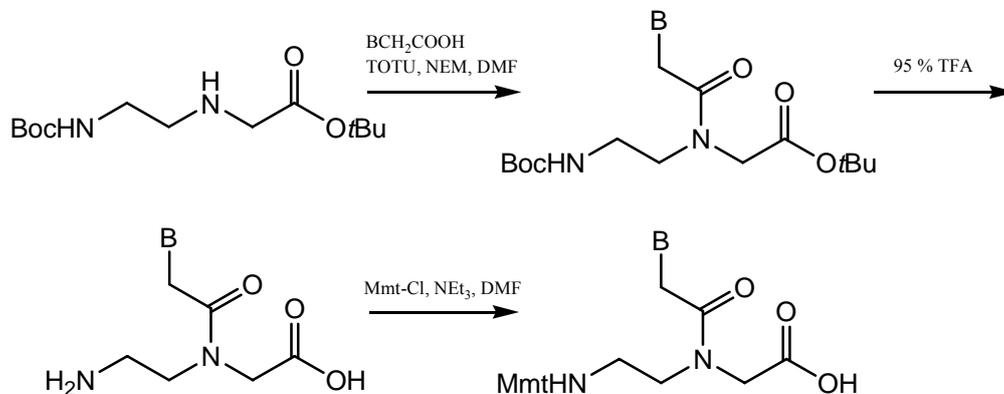


Abbildung 9: Synthese des Mmt-geschützten PNA-Monomers ohne Aufreinigung der Zwischenprodukte

2.4 Monomere mit basenlabiler N-Schutzgruppe

Die Synthese dieser monomeren Bausteine wird auf der Abbildung 10 dargestellt. S. A. Thomson *et al.*^[12] kombinierten die Fmoc-Schutzgruppe mit der Cbz-Schutzgruppenstrategie bei Nucleobasen von P. E. Nielsen *et al.*^[16] Die Monomere wurden durch die Kupplung von Nucleobaseessigsäurederivaten zum Fmoc-geschützten PNA-Grundgerüst dargestellt, wobei BOP oder EDC als Aktivoren benutzt wurden. Die Verwendung von HCl/Dioxan oder TFA führen zur Abspaltung des *tert*-Butylesters. Die Zugabe von Triethylsilan in dieser Stufe ist nur notwendig um die Cbz-Schutzgruppenabspaltung am Adenin-Baustein zu verhindern. Ebenfalls sind Kupplungen zum PNA-Monomer mit den Reagenzien TOTU oder PyBOP möglich. Die größere Schwierigkeit beim PNA-Monomer ist die Spaltung des Methylresters, ohne die Fmoc-Schutzgruppe anzugreifen. Die beobachtete teilweise Abspaltung der Fmoc-

Schutzgruppe bei der Spaltung des Methylesters kann durch eine geringe Menge von Fmoc(ONSu) vor der Aufarbeitung rückgängig gemacht werden.

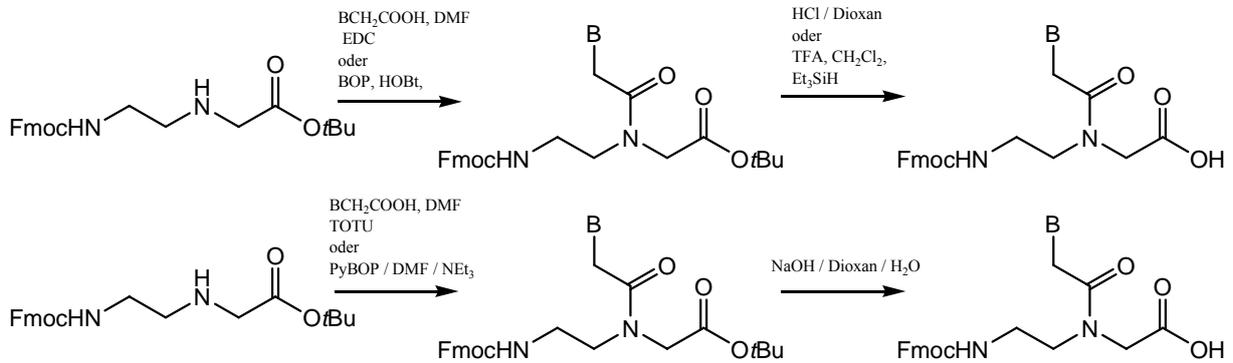


Abbildung 10: Synthese des Fmoc-geschützten PNA-Monomers

2.5 Monomere PNA-Bausteine mit modifiziertem Rückgrat

Strukturen, die Homologe oder Modifikationen des N-Aminoethylglycin-Rückgrates sind, sind in der Literatur bekannt. Diese Grundbausteine kann man in zwei Kategorien einteilen: achirales und chirales Rückgrat.

2.5.1 Monomere mit achiralem Rückgrat

Phosphoresternucleinsäure (PHONAs) sind PNA-Analoga mit einem N-(2-Hydroxyethyl)-aminomethylphosphorsäure-Rückgrat.^[20]

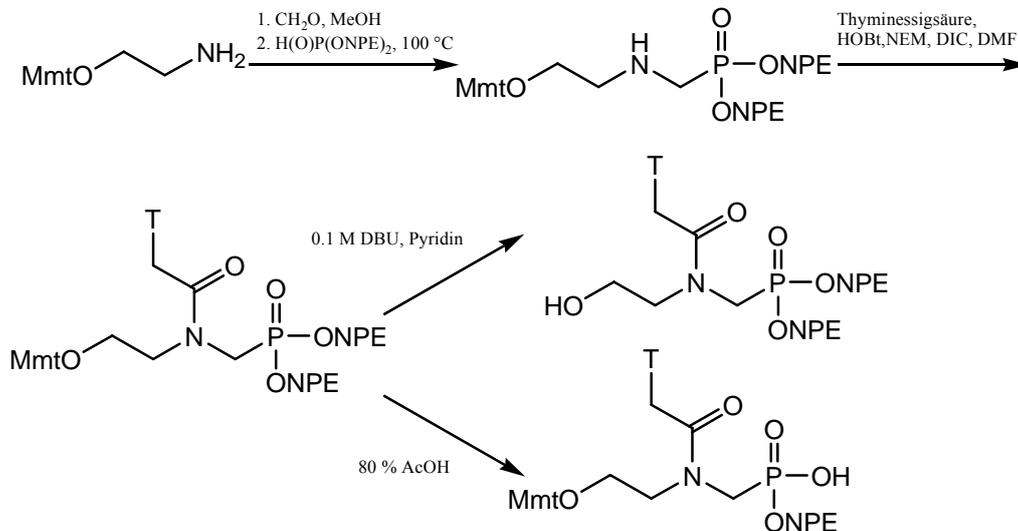


Abbildung 11: Synthese des PHONA-Monomers

Die Synthese von PHONA-Monomeren geht von O-Mmt-geschütztem Aminoethanol mit Formaldehyd und Phosphonsäure-bis[ethyl(4-nitrophenyl)ester] aus. Das geschützte Aminomethylphosphorsäure-Rückgrat wird dabei mit Thyminessigsäure gekuppelt. Selektive Spaltung von einer der NPE-Schutzgruppen mit DBU führt zum gewünschten Thymin-Monomer, was zur Synthese von PHONA-Oligomeren und für die Einfügung in PNA und DNA-Oligomeren geeignet ist. B. Hyrup *et al.*^[21] beschrieben Monomere, die alle Homologe von Aminoethylglycin sind: Aminoethyl- β -alanin (**11**), Aminopropylglycin (**12**) und Aminopropyl- β -alanin (**13**). Variation in der Kettenlänge (**14**) und Art der Verknüpfung (**15**) der Nucleobase an das Aminoethylglycin-Rückgrat. Diese Monomere wurden analog zur Darstellung der Aminoethylglycinderivate synthetisiert. Spezielle Monomere wurden zur Synthese von retroinversen PNAs benötigt (**16**), ebenso wie Heterodimere von N-(2-Aminoethyl)ethylendiamin und Iminodiessigsäure (**17**).

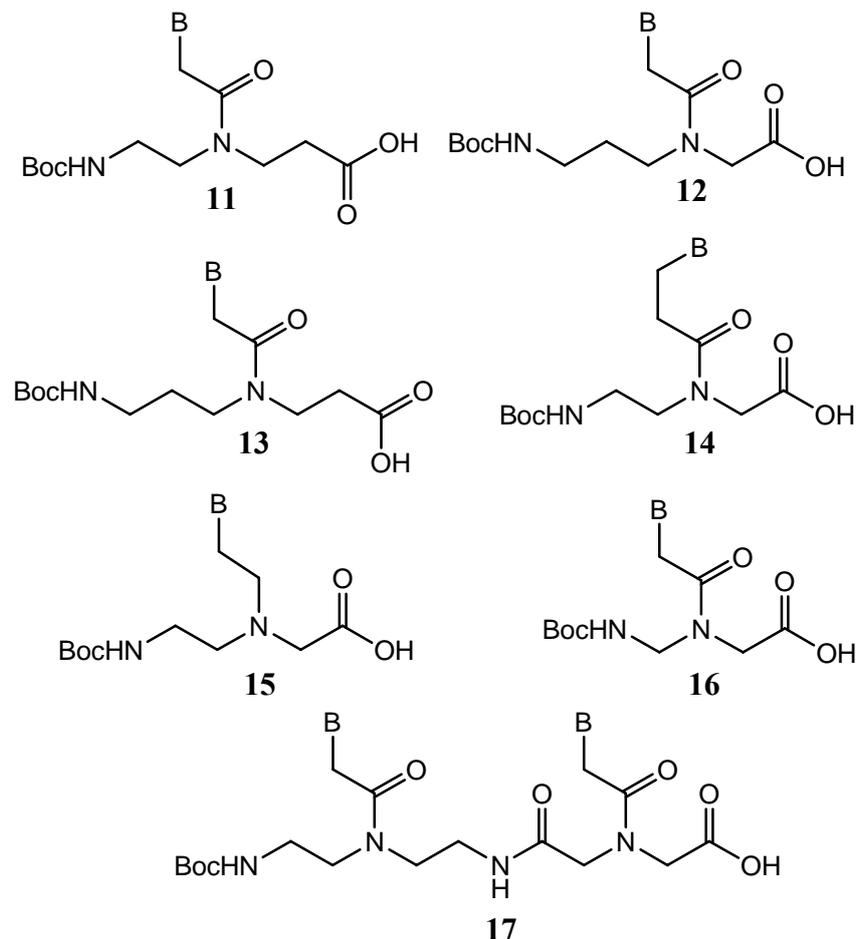


Abbildung 12: Monomere mit modifiziertem Grundgerüst

2.5.2 Monomere mit einem chiralen oder olefinischen Rückgrat^[8]

Monomere mit einem chiralen Zentrum im Rückgrat wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen veröffentlicht. Die Aminosäurederivate, die das Rückgrat bilden, wurden durch die reduktive Aminierung von Boc-Alanin mit Glycinmethylester (**18**) oder von Boc-Glycin mit Aminosäureestern (**19**), gefolgt von einer Kupplung des Nucleobasenessigsäurederivat dargestellt. Weitere Variationen des Rückgrats basierten auf Ornithin (**20**), Prolin (**21,22**), dem konformationel starren Diaminocyclohexan (**23**) und das Phosphoramidit von 2- Aminopropandiol (**24**). Beschrieben sind auch olefinische PNAs (**25**), wo die zentrale Amidbindung durch eine konfigurationsbestimmte CC-Doppelbindung ausgetauscht wurde. PNA-Monomerstrukturen mit zwei chiralen Zentren synthetisierte V. A. Kumar *et al.*^[22] 4(S)-(N-Boc-amino)-2(S/R)-(thymin-1-ylmethyl)-pyrrolidin-N-1-essigsäure (**26**) bringen einen entropischen Vorteil zur Bindung zu komplementären Nucleobasen. Als Erste hat das positiv geladene sterisch gezwungene PNA-Monomer bei Bindung an die komplementäre DNA Einfluss auf die Geometrie des Rückgrats.

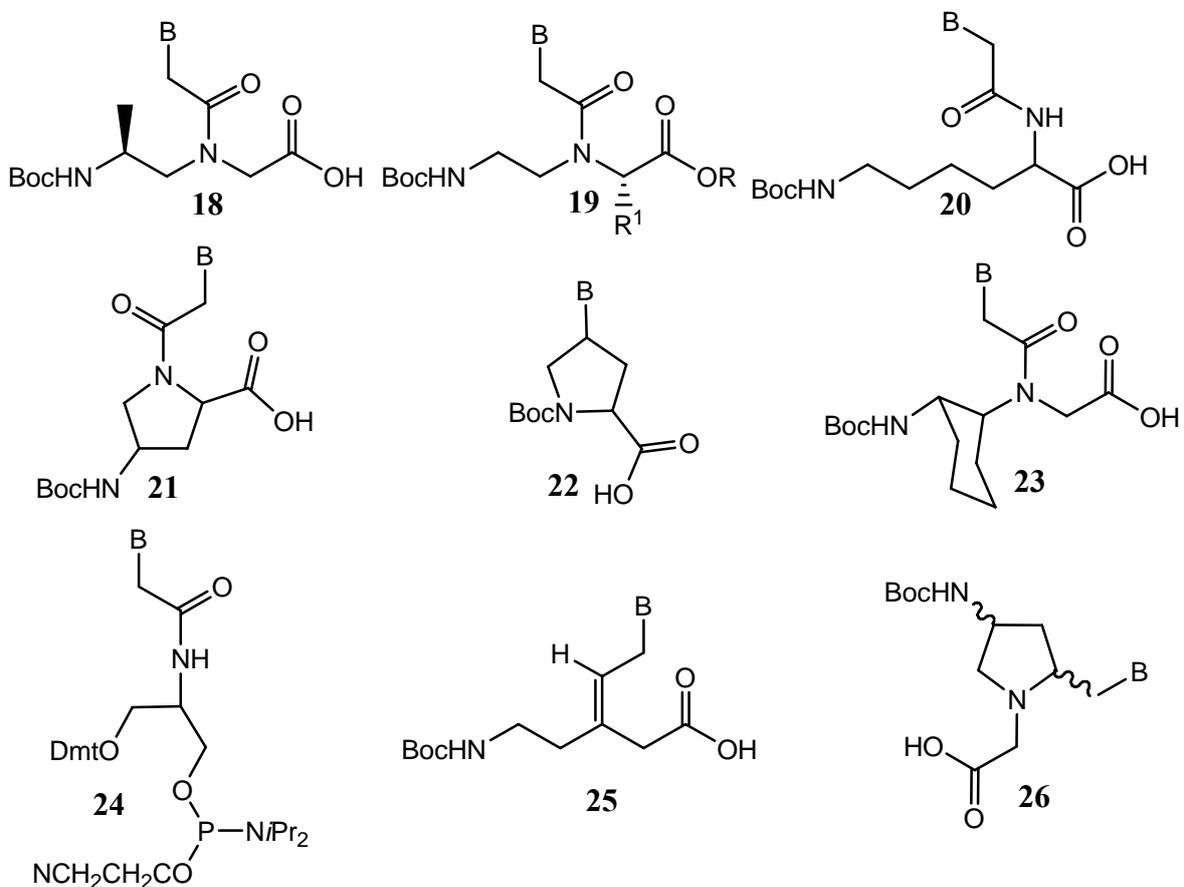


Abbildung 13: Modifizierte PNA-Monomere

2.6 PNA-Oligomer-Synthese

Tabelle 1: Synthesemethoden von PNA-Oligomere

N-Terminale Schutzgruppe	Festphase	Kupplungsmethode (Ausbeute)	Capping	Abspaltung und Entschützung
Boc	MBHA-Polystyren	HBTU, Diethylcyclohexylamin in DMF/Pyridin (97 %)	N1-Benzyloxycarbonyl-N3-methylimidazol triflat	TFA/TFMSA
Boc	MBHA-Polystyren	HATU, DIPEA in NMP/Pyridin (99 %)	Essigsäureanhydrid/ NMP/Pyridin	TFA/TFMSA
Fmoc	MBHA- oder Rink-Harz	Pentafluorphenyl Aktivester (95-99 %)	Essigsäureanhydrid/ DIEA in NMP	HF/Anisol
Fmoc	Breipohl Linker-Polystyren oder Aminohexylsuccinyl-CPG	PyBOP, NEM in DMF (94 %)	-	95 % TFA oder NH ₃ /H ₂ O
Fmoc	Hydroxydodecanoic-säure-CPG	HATU, DIPEA in DMF (94 %)	Essigsäureanhydrid in DMF	NH ₃ /EtOH
Mmt	Aminohexylsuccinyl-CPG oder -Tentagel	HATU oder PyBOP, NEM oder DIEA in DMF (95-99 %)	Essigsäureanhydrid/ Lutidin/N-methylimidazol in THF	NH ₃ /H ₂ O

Die ersten PNAs waren Homopolymere von Thymin, die durch die Merrifield-Festphasensynthese aus einem Boc-L-lysin-derivatisierten MBHA-Polystyrenharz dargestellt und dabei als Produkt das C-terminale Lysinamid gewonnen wurde. Die Lysinseitenkette unterdrückte durch ihre positive Ladung die ungewünschte Tendenz der PNAs mit sich selbst zu aggregieren, wodurch auch die Aufarbeitung vereinfacht wurde. Der Synthesecyclus der PNA-Oligomeren-Synthese besteht im Abspalten der N-terminalen Schutzgruppe, Kupplung des Monomers beim ersten Schritt an die Festphase (27-30)^[8] und bei allen weiteren Schritten Kupplung an den N-Terminus eines weiteren Monomers, was in Ausbeuten von 94-99 % geschieht. Es folgt Capping der unbesetzten Aminogruppen und bei vollständiger Kettenverlängerung des PNA-Oligomers wird dieser von der Festphase abgespalten.

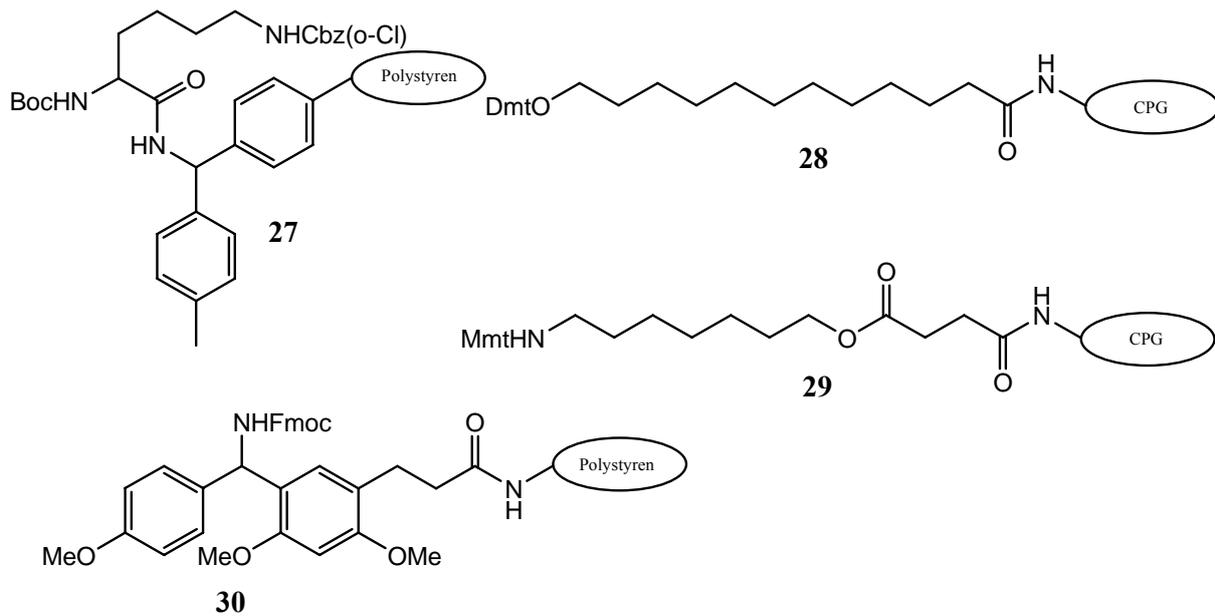


Abbildung 14: Träger der Festphasensynthese zur Synthese von PNA-Oligomere: Boc-Lys(CI-Cbz)-MBHA-Polystyren (**27**), Dimethoxytrityl-12-hydroxydodecansäure-CPG (**28**), Monomethoxytritylamino-hexylsuccinat-CPG (**29**), Breipohl-Linker (**30**)

1994 wurde die erste detaillierte Beschreibung für die Darstellung von Monomeren und deren Anwendung in PNA-Oligomer-Synthesen publiziert.^[16] Die Kupplung wurde durch quantitative Ninhydrin-Tests bestimmt. L. Christensen *et al.*^[16] untersuchten detailliert die verschiedenen Kupplungsbedingungen der Monomere am Beispiel des Aufbaus eines 17mer PNA-Oligomers. Er fand heraus, dass die größte Kupplungseffizienz durch HBTU erreicht wird. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass durch den Einsatz von N1-Benzylloxycarbonyl-N3-methylimidazoltriflat, statt Essigsäureanhydrid als Cappingreagenz, weniger ungewünschte Nebenprodukte entstanden. Die beiden wichtigsten Nebenreaktionen bei der PNA-Oligomersynthese sind die N-Acyltransferreaktion^[23] unter basischen und neutralen Bedingungen und die Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit.^[12]

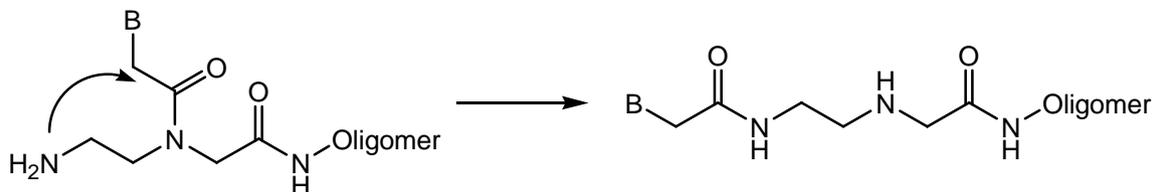


Abbildung 15: N-Acyltransferreaktion

Bei Anwendung von Fmoc-geschützten Monomeren kann es in der PNA-Oligomer-Synthese im Falle der Abspaltung der Schutzgruppe durch Piperidin zur Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit kommen.

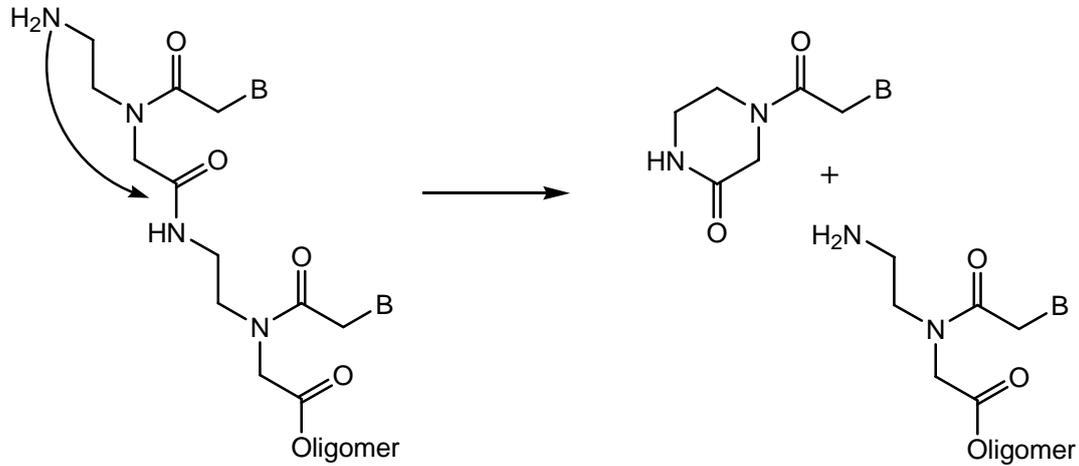


Abbildung 16: Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit

Die N-Acyltransferreaktion konnte bei der Anwendung der Fmoc-Schutzgruppe nicht nachgewiesen werden.

2.7 Chemische und physikalische Eigenschaften von PNAs

2.7.1 Chemische Stabilität

Mit Ausnahme der Nucleobasen haben PNAs und DNA keine gemeinsamen funktionellen Gruppen. Daher verwundert es nicht, dass die beiden Substanzklassen unterschiedliche chemische Stabilitäten besitzen. PNAs sind säurestabil, wohingehend DNAs durch die Zugabe von starken Säuren depuriniert werden. Daher ist es möglich, die in der Peptid-Synthese verwendeten Schutzgruppen, die durch Trifluormethansulfonsäure oder wasserfreies HF abgespalten werden, auch in der PNA-Synthese zu verwenden. PNAs sind ebenfalls unter schwach basischen Bedingungen stabil, so dass auch die durch Ammoniak abspaltbaren Schutzgruppen der Nucleobasen und die durch Piperidin abspaltbare Fmoc-Aminoschutzgruppe in der PNA-Synthese ihren Einsatz finden können. Die einzige erwähnenswerte chemische Instabilität der PNAs hängt mit der freien Amino-Gruppe am N-Terminus zusammen. Wie schon in der PNA-Oligomersynthese beschrieben, kann es zu

einer N-Acyltransferreaktion oder einer hauptsächlich unter basischen Bedingungen stattfindenden Ringschlussreaktion durch Abspaltung der N-terminalen PNA-Einheit kommen. Solche Reaktionen können dadurch verhindert werden, indem die freie Amino-Gruppe gecapped wird.^[12]

2.7.2 Löslichkeit

Pure PNAs sind neutrale Verbindungen mit der Tendenz zur Selbstaggregation und geringer Wasserlöslichkeit. Durch die Einführung von geladenen Gruppen, z.B. das schon erwähnte C-terminale Lysinamid der ersten PNA-Synthese, kann sich die Löslichkeit erhöhen.^[24] H-(t)₁₀-Lys-NH₂ beispielsweise ist bei Konzentrationen von 1.5 mM wasserlöslich.^[24] Die PNA-Löslichkeit sinkt bei zunehmender Länge und zunehmendem Purin:Pyrimidin-Verhältnis.^[25] Überraschend ist, dass E. Uhlmann *et al.* ein Homoadenin PNA-Polymer mit hoher Wasserlöslichkeit fanden.^[8]

Durch den Wechsel von Glycin zu Lysin als PNA-Rückgrat wird eine positive Ladung eingefügt, so dass eine größere Wasserlöslichkeit von Oligomeren beobachtet wird, sobald zwei solcher Gruppen eingefügt werden.

2.8 Bindungsaffinitäten

PNAs binden hervorragend zu komplementärer DNA und sogar noch besser zu komplementärer RNA. Die stärkste Bindungsaffinität hat PNA jedoch zu sich selbst. Da PNAs ungeladen sind, erscheint es vorherbestimmt, dass sie tripelhelicale-Strukturen mit DNA bilden. Das Design der ersten PNAs basierte auf Computermodellen von DNA-Tripelhelices, bei denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat des dritten Strangs durch das PNA-Grundgerüst ersetzt wurde. Obwohl dem Design tripelhelicale-Strukturen zu Grunde lagen, werden Strukturen wie PNA*(DNA)₂ nur bei bestimmten Sequenzen beobachtet. Vorzugsweise bilden sich (PNA)₂*DNA Hybride, was unter Verdrängung des zweiten DNA-Strangs geschieht. Falls die Sequenz ungeeignet für die Bildung von tripelhelicalen Strukturen ist, kommt es zur Bildung von Duplexen wie PNA*DNA, RNA*DNA und bei genügender Konzentration der PNA auch zu Selbstassoziation in Form von PNA*PNA-Duplexen.^[9]

2.8.1 Duplexformation mit komplementärer DNA und RNA

PNAs gehen Watson-Crick Bindungen mit komplementären DNA und RNA-Sequenzen ein. Im Unterschied zur DNA können PNAs sowohl in der parallelen als auch in der antiparallelen Orientierung binden, wobei der C-Terminus der PNA dem 3'-Ende und der N-Terminus dem 5'-Ende der normalen Oligonucleotide entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass die antiparallele Orientierung bevorzugt wird. PNA*DNA-Hybride sind stabiler als die entsprechenden DNA*DNA-Komplexe. Die erhöhte Stabilität führt zu einer Erhöhung des T_m von durchschnittlich 1 K/Base. Antiparallele PNA*RNA Duplexe sind sogar noch stabiler mit ΔT_m von 1.5 K/Base relativ zu DNA*RNA-Hybriden. Daher sind PNA*RNA-Duplexe stabiler als die jeweiligen PNA*DNA-Duplexe, im Durchschnitt um 0.2 – 0.5 K/Base. Die thermodynamische Stabilitäten von parallelen PNA*DNA und PNA*RNA-Duplexen sind beinahe dieselben, wie die der jeweiligen antiparallelen Strukturen von DNA*DNA und DNA*RNA-Duplexen. Gemessen wurden ebenfalls dramatische Veränderungen in der Kinetik der Bildung von Duplexen anderer Orientierung.^[10] Durch die Verwendung der kapillaren Elektrophorese konnte D. J. Rose^[26] feststellen, dass sich Duplexe mit antiparalleler Orientierung sofort bilden (<30 s) und Duplexe mit paralleler Orientierung einige Stunden für ihre Bildung benötigen.

Ein interessanter Aspekt bei der Bildung von PNA*DNA-Duplexen ist die Abhängigkeit der Ionenstärke. S. Tomac *et al.*^[27] untersuchten den Vergleich des T_m von DNA*DNA-Hybriden zum T_m von PNA*DNA-Duplexen bei zunehmender Salzkonzentration. Der T_m von DNA*DNA-Hybriden bei einer zunehmenden Salzkonzentration von 0.01 zu 0.5 M NaCl nimmt merklich zu (>20 K für ein 10-mer). Der T_m von PNA*DNA-Duplexen nimmt jedoch unter gleichen Bedingungen ab (ca. 8 K), so dass die Stabilität bei einer Salzkonzentration von 0.5 M für beide Duplexe gleich ist. Bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration konnten nur kleine Destabilisierungseffekte sowohl bei DNA*DNA als auch bei PNA*DNA-Duplexen beobachtet werden. Die Salzkonzentrationsabhängigkeit kann durch die Assoziation von Gegenionen im Falle von DNA*DNA-Duplex-Bildungen und durch Verschiebung von Gegenionen im Falle von PNA*DNA-Duplexen erklärt werden.

Eine fehlerhafte Basenpaarung führt zur Abnahme des T_m von 8 - 20 K; diese Absenkung ist im Vergleich zu DNA*DNA-Duplexen doppelt so hoch.^[10]

Der Austausch der Aminosäure Glycin in PNA-Bausteinen durch andere Aminosäuren hat verschiedene Auswirkungen auf die Duplexstabilität, die abhängig von der eingesetzten Aminosäure ist. In allen Fällen ist die D-Konfiguration bevorzugt. Kleine ungeladene

Seitenketten, wie D-Alanin und D-Serin, haben keinen Effekt auf die Dublexstabilität. Positiv geladenen Seitenketten, wie D-Lysin, haben eine stabilisierende Wirkung von ungefähr 1 K/Einheit, wobei negativgeladene Seitenketten, wie D-Glutaminsäure, einen destabilisierenden Effekt haben.

2.8.2 Bildung von Tripelhelices

PNA Oligomere mit einem hohen Pyrimidin : Purin-Anteil bildet mit einer komplementären DNA normalerweise eine ungewöhnlich stabile $(\text{PNA})_2 \cdot \text{DNA}$ Tripelhelix aus.^[9] Die Bindungen in solchen Komplexen besteht hauptsächlich aus Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarungen, wobei sehr stabile Komplexe mit einem T_m von >70 °C erreicht werden. Die Stabilität solcher Komplexe hängt von der Länge der Oligomere ab. Die durchschnittliche Erhöhung von T_m beträgt etwa 10 °C pro Basenpaar. Die Bildung von Tripelhelices, die Cytosin in einer Homopyridin PNA enthalten, ist gemäß der Bildung von C^+GC -Triplexen pH-abhängig. Die Stabilität ist am höchsten bei pH 5 (C^+GC).

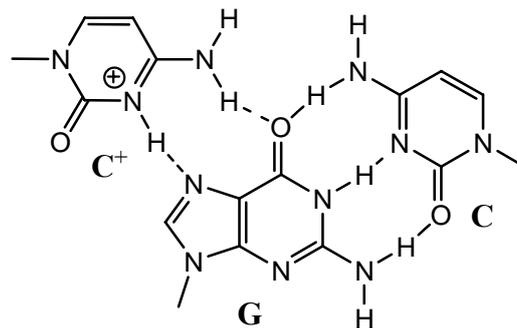


Abbildung 17: C^+GC -Basen-Triplett

Überraschend ist dabei, dass bei pH 9 (CGC), obwohl die Protonierung von Cytosin nicht erwartet wird, diese Sequenz zur Stabilität beiträgt. Dies könnte bedeuten, dass das Cytosin mit nur einer Wasserstoffbrücke eine Hoogsteen-Basenpaarung eingeht oder der pK_a -Wert von Cytosin erheblich erhöht wurde, so dass eine partielle Protonierung möglich ist. Die pH-Abhängigkeit von Homopyridin PNA wird ganz aufgehoben, indem man statt Cytosin Pseudoisocytosin einbaut. Diese Nucleobase kann mit Guanin zwei Wasserstoffbrücken über Hoogsteen-Basenpaarung und drei Wasserstoffbrückenbindungen über Watson-Crick-Basenpaarungen ausbilden. Analog zu C^+GC -Triplexen ist der TAT-Triplex zu sehen:

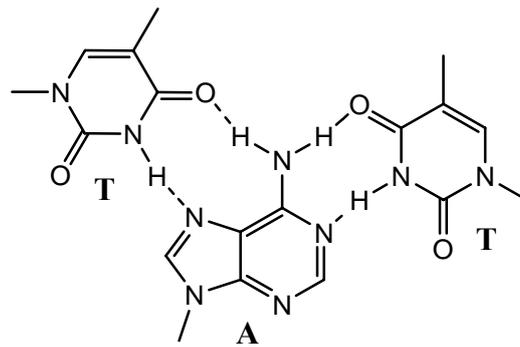


Abbildung 18: TAT-Basen-Triplett

Die antiparallele Duplexbildung wird sowohl thermodynamisch als auch kinetisch vor der parallelen Orientierung bevorzugt. Das gleiche trifft auch auf die Bildung von Tripelhelices zu. Ebenfalls bildet PNA stabile $(\text{PNA})_2 \cdot \text{RNA}$ Tripel-Helices mit RNA aus. Obwohl diese Bildungen weniger untersucht wurden wie Tripel-Helices von DNA, sind ihnen doch die T_m ähnlich. Bisherige Daten über die Bildungen von Tripelhelices mit RNA wurden hauptsächlich bei biologischen Experimenten gewonnen. Beispielsweise konnte die Translation der CAT-mRNA durch die Bildung einer Tripelhelix mit PNA inhibiert werden. Die Bildung eines Duplex mit PNA hatte hingegen keine inhibierende Eigenschaft.^[28]

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit und das der Arbeitsgruppe Göbel ist es, RNA-Liganden zu synthetisieren, die selektiv an RNA-Helices angreifen und kurze Triplex-Strukturen über Hoogsteen-Basenpaarung eingehen. Durch hohe Affinitäten an RNA-Strukturen, wie z.B. die HIV-1 TAR-RNA, war es möglich, dass die Bildung eines Tat/TAR-Komplexes inhibiert wurde. Als Beispiel eines RNA-Liganden wurde das Chinolinderivat (**1**) genommen, welches im Rahmen dieser Diplomarbeit synthetisiert wurde. Das Chinolin soll durch Wasserstoffbrückenbindungen in der großen Furche das Watson-Crick-Basenpaar AU in der RNA und AT in der DNA angreifen:

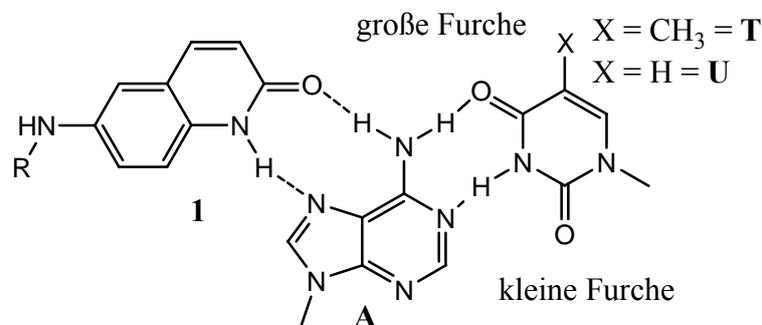


Abbildung 19: Basen-Triplett-Bildung Chinolin(1) A(T/U)

Durch die Synthese des Iminoquinolins (**31**) aus dem Chinolinderivat (**1**) ist es möglich über Hoogsteen-Basenpaarung das Watson-Crick-Basenpaar GC anzugreifen, was auch durch unterschiedliche Konfigurationen des Iminoquinolins im Raum möglich ist.

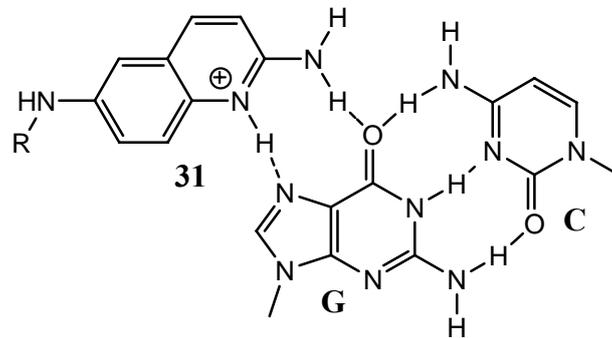


Abbildung 20: Basen-Triplett-Bildung Imino-Chinolin(**31**) A(T/U)

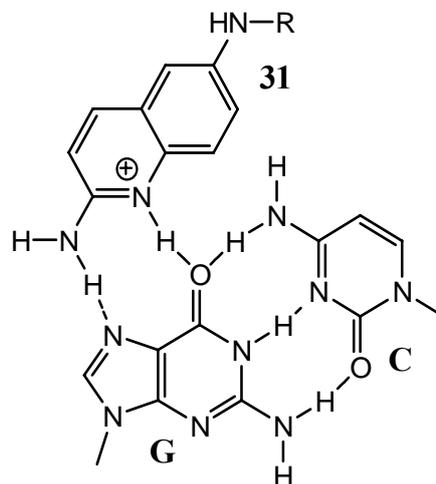


Abbildung 21: Basen-Triplett-Bildung Imino-Chinolin(**31**) A(T/U)

2.9 Strangverdrängung

Die Neigung von Homopyrimidin-PNAs (PNA)₂*DNA-Tripelhelices zu bilden, ist so stark, dass unter bestimmten Bedingungen eine Tripelhelix mit einem der beiden DNA-Stänge in eine Doppelstrang DNA ausgebildet und der andere Strang verdrängt wird. Der verdrängte Strang bildet daraufhin einen einsträngigen Loop aus. Die Voraussetzungen für eine solche Verdrängung sind ein nicht zu stabiler DNA Doppelstrang (dsDNA), wie eine A-T reiche Region, sowie eine niedrige Salzkonzentration.^[29] Selbst unter dem Elektronenmikroskop sind solche Strukturen zu erkennen.^[30]

In genauen kinetischen Studien wurde die Abhängigkeit der Salzkonzentration untersucht.^[31] Dabei fand man heraus, dass die Aktivierungsenergie, die für eine Verdrängung des einen Stranges notwendig ist, mit erhöhter Salzkonzentration zunimmt. Dies ist eindeutig mehr ein kinetischer als ein thermodynamischer Effekt. Eine Verdrängung wurde jedoch nicht unter einer Salzkonzentration von 80-100 mM und über 500 mM beobachtet.

Die Verdrängung des Strangs ist höchst sequenzspezifisch. Bei einer Fehlbasenpaarung kommt es zu einer Erhöhung der Aktivierungsenergie um 20 kJ/mol. Bei zwei Fehlpaarungen konnte keine Verdrängung beobachtet werden.

Durch die Verwendung eines Transkriptionsassays konnte gezeigt werden, dass die Verdrängung des Strangs sehr schnell voranschreitet (50 % in 4 Minuten) und die Dissoziation der PNA von diesen Komplexen sehr langsam von statten geht (~50 % in 5-20 Stunden).^[32]

2.10 Struktur von PNA*DNA-Duplexen

Strukturinformationen wurden durch NMR-Spektroskopiestudien von zwei antiparallelen PNA*DNA-Duplexen (8-mer und 10-mer) erlangt. Konformationell ist der DNA-Strang ähnlich der B-Form mit einer glycosidischen *anti*-Konformation und der Deoxyribose in C2'-*endo* Form. Durch NOESY konnte eine Watson-Crick-Basenpaarung gezeigt werden. Ebenso konnte durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen bei antiparallelen PNA*DNA-Duplexen sowohl die A-Form (laterale Positionierung der Basenpaarung) als auch B-Form DNA (Rückgratkrümmung, Neigung der Basenpaare und helicale Steigung) gefunden werden (siehe Abbildung 25). Die rechtshändige Helix beinhaltet pro 360° etwa 13 Basenpaarungen, vergleichbar mit 10 Basenpaaren bei der B-Form der DNA. Die Major Groove ist aufgeweitet, die Minor Groove daher flach und eng. Die Basenstapelung variiert erheblich innerhalb der Sequenz. Die primären Amidbindungen des PNA-Grundgerüsts sind, ohne Ausnahme, in der *trans*-Konfiguration. Die Carbonylgruppe des Rückgrat-Nucleobase-Linkers zeigt in Richtung des C-Terminus des PNA-Strangs, während die Amid-Carbonylgruppen des Grundgerüsts, mit einigen Ausnahmen, zum Lösungsmittel zeigen. Im PNA*DNA-Duplex gibt es keine Anhaltspunkte, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Amid und der Carbonylgruppe des Rückgrats kommt.^[8,10]

2.11 Struktur von PNA*RNA-Duplexen

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen des PNA*RNA-Duplexes durch Isotopen-Markierung konnte nachgewiesen werden, dass alle Nucleobasen Watson-Crick-Basenpaarungen eingehen, der Torsionswinkel der Glycoside im RNA-Strang eine *anti*-Konformation aufweist und die Ribose in der 3'-*endo* Form vorliegt. Der RNA-Strang befindet sich in der A-Form-Struktur (siehe Abbildung 25). Die tertiären Amine sind alle in der *cis*-Konformation und die sekundären Amide im Rückgrat gehen keine Wasserstoffbrückenbindungen ein. Die Carbonylgruppe des tertiären Amins im PNA-Grundgerüst ist isosterisch zu der C2'-Hydroxygruppe, wodurch sich der Kontakt zum Lösungsmittel mit dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe erhöht. ^[8,10]

2.12 Struktur von (PNA)₂*DNA-Tripelhelices

Durch Röntgenstrukturanalysen eines Komplexes von bis(PNA) mit komplementärer antiparalleler DNA konnte die Struktur von (PNA)₂*DNA-Tripel Helices erhalten bleiben. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Nucleobasen des PNA-Strangs durch Watson-Crick- und Hoogsteen-Basenpaarung an die DNA binden. Die Struktur ist sowohl von der A-, als auch von der B-Form zu unterscheiden. Es kommt dabei zur Bildung einer „P-Helix“ mit 16 Nucleobasen pro 360°. Die DNA-Phosphatgruppen sind dabei durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Proton des Amins, des PNA-Rückgrats, das durch Hoogsteen-Basenpaarung bindet, verbunden. Diese Wasserstoffbrückenbindungen, zusammen mit den zusätzlichen van-der-Waals-Kräften und der Abwesenheit von elektrostatischen Abstoßungen, sind die Hauptfaktoren, die für die enorme Stabilität von Tripel-Helices verantwortlich sind. Die Desoxyribose des DNA-Strangs ist, wie in der A-Form der DNA, in der C3'-*endo*-Konformation (siehe Abbildung 25 und 26). Die Nucleobasen liegen fast senkrecht zu der Helixachse, was charakteristisch für die B-Form der DNA ist. Die Watson-Crick PNA-DNA-Interaktionen werden zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen des Lösungsmittels mit der Minor Groove stabilisiert. ^[10,8]

2.13 Biologische Eigenschaften von PNAs

2.13.1 Stabilität in biologischen Systemen

Die Anwendung von PNAs als Antisense oder Antigen-Therapeutika macht es notwendig, dass sie eine ausreichend hohe biologische Stabilität im Serum und in Zellen aufweisen. Ebenso wie unmodifizierte Oligonucleotide relativ schnell im Serum durch Nucleasen zersetzt werden, könnte dies bei PNAs mit einer peptidähnlichen Struktur potenziell von Peptidasen oder Proteasen erfolgen. Trotzdem weisen PNAs eine hohe Biostabilität sowohl in menschlichen Seren als auch im Zellextrakt auf. Die folgende Abbildung zeigt die Stabilität des PNA-Oligomers H-(t)₈-Lys-NH₂ im Vergleich zum unmodifizierten Oligonucleotid (T)₈ bei Inkubation mit frischem Meerschweinchenserum. [8]

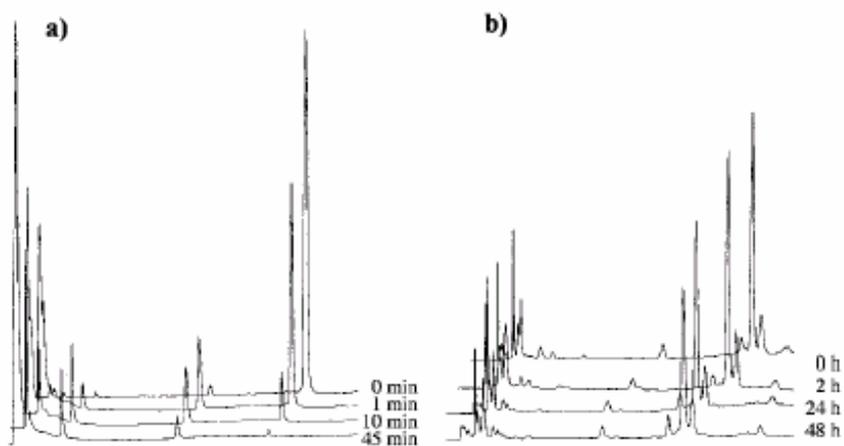


Abbildung 22: HPLC-Diagramm zum Vergleich der Stabilität von unmodifizierter DNA und PNA in frischem Meerschweinchenserum: a) unmodifizierte DNA (T)₈ b) PNA H-(t)₈-Lys-NH₂

Die HPLC-Analyse zeigt für das natürliche Oligonucleotid eine außergewöhnlich kurze Halbwertszeit von nur einigen Minuten, wohingegen die Halbwertszeit des modifizierten Oligonucleotids zwei Tage beträgt. Im Unterschied zu den Oligonucleotiden, bei denen die Abbauprodukte beobachtet werden können, bauen sich die PNA-Oligomere zu nicht detektierbaren Abbauintermediaten ab. Es ist somit möglich, dass das Verschwinden der PNA des Meerschweinchenserums nicht durch Degradation, sondern durch langsame Assoziation mit Komponenten des Serums zustande kommt.

2.13.2 Zelluläre Aufnahme von PNAs

Die zelluläre Aufnahme von PNAs ist extrem niedrig. Es ist daher nicht überraschend, dass es wenige Veröffentlichungen von antisense Aktivitäten reiner PNAs in Zellkulturen gibt, ohne dass Techniken verwandt wurden, um die Barriere der Zellmembran zu überwinden. Die antisense- und antigen-Aktivität von PNAs wurde untersucht, indem man die PNAs durch direkte Mikroinjektionen in die Zelle einführte. Alternativ ist die Permeabilität der Zellmembran durch die Zugabe von Lysolectin oder Detergentien wie Tween 20 möglich, die die Aufnahme von PNAs in Zellen ermöglichen. Eine kovalente Knüpfung von Peptiden an PNAs, die selektiv an die Zelloberflächenrezeptoren binden, kann die zelluläre Aufnahme erhöhen.^[10]

Der therapeutische Nutzen von PNAs als Antisense-Agens ist, trotz der guten Nucleasestabilität, von der intrazellulären Verfügbarkeit des Oligomers abhängig.

E. Chiarantini *et al.*^[33] entwickelten ein System, das es erlaubt, eine PNA durch die intakte Macrophagenmembran zu bringen. Dabei wurde eine 14-mer PNA synthetisiert, die durch Expressions-Inhibierung der Stickstoffoxid-Synthase (NOS) die Stickstoffmonoxidproduktion herabsetzt. Durch hypotonische Dialyse wurde die PNA in Erythrocyten eingeführt. Diese mit PNA beladenen Erythrocyten werden spezifisch von Rinder-Makrophagen phagocytosiert. Dabei kommt es zur Insertion der PNA in die Makrophagen, was durch eine Reduzierung der NO-Konzentration nach Zugabe der Erythrocyten zu beobachten ist. Durch dieses System ist es möglich, PNAs selektiv durch intakte Membranen zu insertieren.

P. Eisenhut *et al.*^[34] synthetisierten PNA-Peptid Konjugate als Antisense-Agens für Tumorzellen. Dabei wurde als Peptid Somatostatin verwendet, da bei bestimmten Tumorzellen Somastatin-Rezeptoren gefunden wurden. Das Konjugat kann somit selektiv in Tumorzellen, die Somastatin-Rezeptoren tragen, insertiert werden. Die Aktivität des radioaktiv markierten Konjugates wurde an Tumoren von Lewis Ratten bestimmt, wobei eine selektive Anreicherung der PNA gemessen werden konnte.

Die Aufnahme von Antisense PNA-Konjugaten in *Escherichia coli* wurde durch P. E. Nielsen *et al.*^[35] untersucht. Dazu wurde ein zellpermeables Peptid der Sequenz KFFKFFKFFK mit dem PNA-Oligomer verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass die PNA-Peptid-Konjugate die Antisense-Aktivität in der Zelle um den Faktor zwei erhöhte.

2.14 Inhibition der Genexpression

2.14.1 Inhibition der Translation

Die sequenzspezifische Inhibition von Replikation, Transkription und Translation durch PNAs kann potenziell nach therapeutischen Anwendungen untersucht werden. Der grundlegende Mechanismus des Antisense-Effekts durch Oligodesoxynucleotide besteht entweder aus einer durch Ribonuclease H (RNase H) eingeleiteten Spaltung des RNA-Strangs in Oligonucleotid-RNA Heteroduplexen oder durch eine sterische Hinderung des Translationsprozesses. PNA*RNA-Duplexe können nicht als Substrate für RNase H wirken. Normalerweise basiert der Antisense-Effekt der PNAs auf der sterischen Blockade der RNA-Prozessierung, des Transports ins Cytoplasma oder der Translation. PNAs sind dazu fähig, die Translation zu inhibieren, wobei das AUG-Startcodon durch eine komplementäre PNA überlappt wird. PNAs, die Triplexstrukturen ausbilden können, können die Translation in Kodierungsbereichen der mRNA inhibieren. Dies setzt jedoch voraus, dass ein Homopurin Target von 10–15 Nucleobasen vorliegt. Duplexformende PNAs sind für solche Inhibierungen ungeeignet.^[8]

Mologni *et al.*^[36] zeigten drei verschiedenen Antisense-Effekte in *in vitro* Expression des PML/RAR α -Gens. Der Erste war komplementär zur ersten AUG-(Initiation)-Stelle. Dem Zweiten gelang eine Bindung an eine Sequenz in der Kodierungsregion, der Startseite für die Synthese des aktiven Proteins. Das dritte PNA-Oligomer bindet an das 5'-Ende der mRNA. Zusammen konnten die drei PNAs effektiv die Translation inhibieren. Die Inhibierung wurde sogar bei Konzentrationen der drei PNAs erreicht, die weit unter der kritischen Konzentration, die jede einzelne PNA zur Inhibierung benötigt hätte.

Untersuchungen an *E. coli*-Zellen, die permeabel für PNA-Oligomere sind, zeigten sich beim Einsatz von PNA-Oligomeren, die komplementär zur Startcodonregion der mRNA für die Expression von β -Galactosidase und β -Lactamase sind, dass die Genexpression inhibiert wurde.^[35]

2.14.2 Inhibierung der Transkription

PNAs sind durch ihre Eigenschaft, stabile Triplexstrukturen auszubilden, befähigt, Transkriptionsprozesse aufzuhalten und in Doppelstränge einzudringen, sowie Stränge zu verdrängen. Solche Komplexe können eine sterische Blockade ausbilden, die die RNA-

Polymerasefunktion einschränkt. *In vitro*-Studien legen die Annahme nahe, dass sowohl prokaryotische und eukaryotische RNA-Polymerasen in ihrer Funktion gestört werden können. PNAs, die komplementär zur Promotorregion der DNA sind, bilden stabile Komplexe, die den Zugang der Polymerase erschweren. Auch PNAs, die im kodierenden Bereich der DNA binden, können den Transkriptionsprozess inhibieren.^[37] P. E. Nielsen *et al.*^[38] konnte zeigen, dass sogar eine 8-mer PNA befähigt ist, die T₃-Polymeraseaktivität von Phagen zu blockieren.

Ein (PNA)₂*DNA-Triplex kann die Transkription *in vitro* inhibieren und ist befähigt, als ein Antigenvermittler zu agieren. Die einzige Schwierigkeit bei der Bildung der notwendigen Triplexstrukturen ist, dass bei physiologischen Salzkonzentrationen die Invasion des PNA-Oligomers relativ langsam erfolgt. Durch Linker, die die Watson-Crick- und Hoogsteen-PNA kovalent verbinden oder positiv geladene Lysinreste im PNA-Strang, kann die Assoziationsraten mit dsDNAs drastisch erhöht werden. M. Lee *et al.*^[39] konnten zeigen, dass die PNAs, die komplementär zum Primer des HIV-1-Genoms sind, *in vitro* die Initiation der Reversen Transkriptase (RT) blockiert. Oligomere PNAs, die auf verschiedene kritische Regionen des viralen Genoms zielen, haben wahrscheinlich ein starkes therapeutisches Potenzial.

2.15 PNA-Oligomere als Inhibitoren des Tat/TAR-Komplexes

Gait *et al.*^[40] verwendeten zur Inhibierung des Tat-TAR-Komplexes synthetische Oligodeoxynucleotide komplementär zur HIV-1 Haarnadel- und Bulge-Region. Dabei fanden sie durch Gel Mobility Shift Assays heraus, dass *in vitro* synthetische Oligodeoxynucleotide die Tat-TAT-Wechselwirkung blockieren können. PNAs sind besonders stabil im humanen Serum und Zellextrakten, zeigen antisense Aktivitäten und können in DNA-Duplexe eindringen und dabei einen der DNA-Stränge verdrängen. PNAs können als antisense Moleküle für die Regulation von Genexpressionen verwendet werden, wobei die daraus gebildeten Komplexe energetisch stabiler sind als die jeweiligen DNA*DNA und DNA*RNA-Komplexe. Da PNAs ihr Ziel sequenzspezifisch erkennen, synthetisierte V. Pandey *et al.*^[6] ein PNA 15mer, das komplementär zur minimal funktionellen TAR-Sequenz ist (Haarnadelschleife und Bulge).

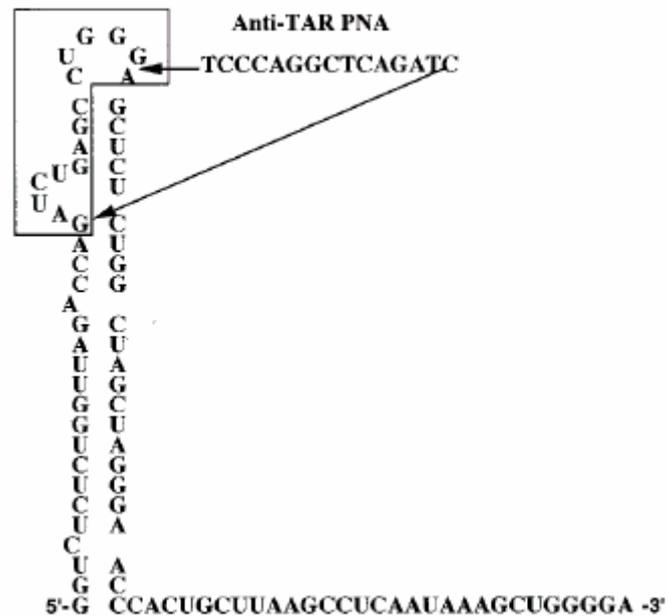


Abbildung 23: Struktur und Sequenz der Anti-TAR PNA und deren Bindungsstelle der Haarnadelschleife und dem Bulge der TAR-RNA

Dabei kam es zur effektiven Inhibierung der Transaktivierung des HIV-1 LTR. Als Negativkontrolle wurde in den Versuchen eine zufällige PNA-Sequenz benutzt, um die Spezifität der Anti-TAR PNA zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Anti-TAR PNA das Tat-Protein davor hindert, einen Komplex mit der TAR-RNA einzugehen.

In einer nachfolgenden Veröffentlichung ^[41] wurden die Bindungsaffinitäten von verschiedenen langen PNA-Oligomeren untersucht. Man verglich Anti-TAR-PNAs, die sowohl die gesamte Haarnadelschleife und Bulge binden (PNATAR-16 und PNATAR-15), weniger Nucleotide in der Haarnadelschleife aufweisen (PNATAR-13) oder sowohl im Loop als auch am Bulge weniger Nucleotide aufweisen (PNATAR-12). Alle vier Sequenzen wiesen starke Affinitäten zu TAR auf, jedoch hängt die Stärke der Inhibierung der reversen Transkriptase von der Länge der Sequenz ab. PNATAR-16 zeigt eine Reduzierung der HIV-1-Produktion um 99 %.

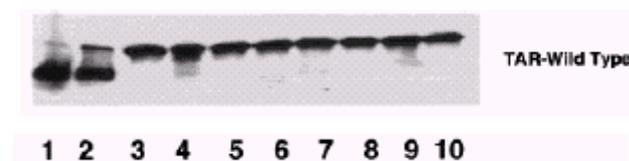


Abbildung 24: Gel Mobility Shift Assay der Bindung der Anti-TAR PNA zum Wildtyp der TAR-RNA. Linien 1-10 representieren die molaren Verhältnisse von TAR zur Anti-TAR PNA von 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 und 1:8

Die Anti-TAR-RNA bildet einen festen Komplex mit TAR-RNA in molaren Verhältnissen von 1:1. Solche Versuche wurden mit einem Gel Mobility Shift Assay durchgeführt, der ebenfalls nachweisen konnte, dass eine hohe Affinität zu TAR-RNA vorhanden ist. Zufällige PNA-Sequenzen haben keine Auswirkung auf die Mobilität der TAR-RNA. Die Bindungsaffinität von Anti-TAR-RNA ist nicht vorhanden oder reduziert, falls die TAR-RNA Mutationen in der Haarnadelschleife aufweist. Die Zugabe von Anti-TAR-PNA zu Tat/TAR-Komplexen führt zur Zersetzung des Komplexes, was den Schluss zulässt, dass die ladungsfreie PNA den Komplex durch Verdrängung des Tat-Proteins zersetzt.^[6]

Diese Ergebnisse wurden durch *in vitro* Transkription von Plasmiden, die das Reportergen CAT unter der Kontrolle des HIV LTR exprimieren, im Zellkernextrakt von HeLa-Zellen mit und ohne Tat und Anti-TAR-PNA bestätigt. Es wurde beobachtet, dass es zur Anreicherung des vollständigen HIV-1 Transkripts durch die Zugabe von Tat kam und durch Zugabe von Anti-TAR-PNA die Transkription inhibiert wurde. Wie vorher angenommen, inhibiert Anti-TAR-PNA *in vitro* die Transkription des pHTLV-LTR. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die PNA spezifisch die Tat-TAR-Wechselwirkung verhindert, was zum Verlust der von Tat vermittelten Transaktivierung der Transkription führt.^[6]

In einem aktuellen Patent von V. Pandey *et al.*^[4] wurde die Bioverfügbarkeit von Anti-TAR-PNA in Zellen durch die Konjugation an Membran Transductionspeptide (MTD) erhöht. Das MTD fungiert als Transporter der PNA, das sowohl in die Lipid-Doppelschicht von Zellen, die den Virus enthalten, als auch in das Virus selbst durchdringen kann.

3 Biologischer Hintergrund

Die Interaktion zwischen RNA und biologischen Makromolekülen ist essenziell für viele Lebensprozesse in der molekularen Biologie. Daher scheint es naheliegend, dass auch kleine molekulare Wirkstoffe mit Massen unter 1000 Da eine vermittelnde Rolle in diesen Prozessen spielen können. Zusätzlich werden zurzeit Anstrengungen unternommen, potenzielle Inhibitoren für Retroviren darzustellen.^[42] Im Gegensatz zur DNA besitzt die RNA verschiedene selektive Vorteile als therapeutische Zielstruktur. Erstens ist die chromosomale DNA umfangreich gepackt, so dass der Zugang durch kleine Moleküle erheblich eingeschränkt ist. Auf der anderen Seite ist eine RNA hochstrukturiert, aber trotzdem eine zugängliche Zielstruktur. Zweitens gibt es in der Zelle Reparaturmechanismen für die DNA, wohingegen für die RNA zurzeit keine bekannt sind. Drittens besitzt die RNA eine große Diversität durch tertiäre Faltung, so dass sie ein größeres Potenzial für selektive Angriffspunkte, basierend auf Struktur und weniger auf Sequenz, liefert.^[1] Es gibt verschiedene Klassen dieser kleinen Moleküle wozu die organischen Farbstoffe, organischer Kationen, anorganischer Metallkomplexe und Antibiotika zählen. Durch die Interaktion mit solchen Molekülen wurden wertvolle Ergebnisse über die RNA-Struktur und deren Bindungseigenschaften gewonnen. Jedoch ist ein tieferes Verständnis der Interaktion von RNA-Liganden notwendig, um durch Design RNA-bindende antivirale Wirkstoffe oder Translationsinhibitoren zu synthetisieren.^[42] In diesem Kapitel soll auf den Aufbau und die molekulare Erkennung von RNA, sowie auf RNA-Ligand-Wechselwirkungen eingegangen werden. Als Beispiel dafür stehen die Aminoglycoside und die TAR-RNA des HIV-1.

3.1 RNA Struktur

Natürlich vorkommende RNAs sind globulär mit kurzen doppelhelicalen Domänen mit Konformation der A-Form (siehe Abbildung 25) durch einsträngigen Regionen miteinander verbunden. Die Sekundärstrukturen der doppelhelicalen Domänen werden durch Watson-Crick-Basenpaarungen zusammengehalten.^[43]

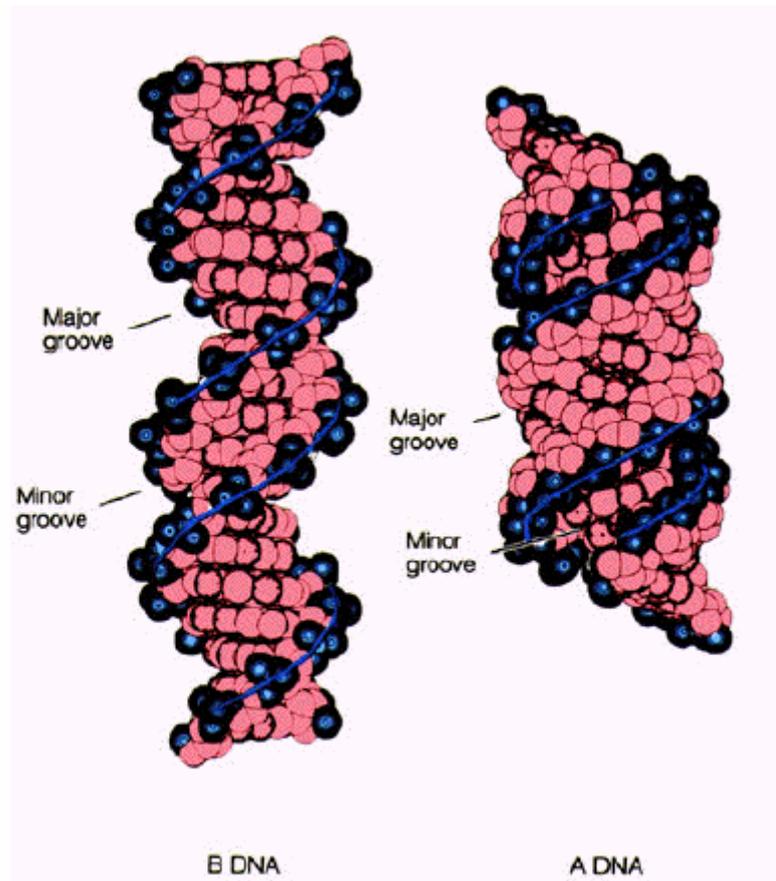


Abbildung 25: Konformation der B- Form DNA und der A-Form DNA^[77]

In der A-Form (siehe Abbildung 25) Duplexkonformation sind die Nucleobasen von der Helixachse nach außen in die Minor Groove verschoben und in Bezug zur Helixachse beträchtlich geneigt. Die resultierende Helix hat eine flache und weite Minor Groove, sowie eine große aber schwer zugängliche Major Groove, die tief ins Innere des Moleküls verschoben ist. Die Grundlage für die Konformation der A-Form ist die C_3 -endo Faltung des Zuckers, was zu einem kurzen Abstand von $\sim 5.9 \text{ \AA}$ zwischen zwei Phosphaten führt.^[44]

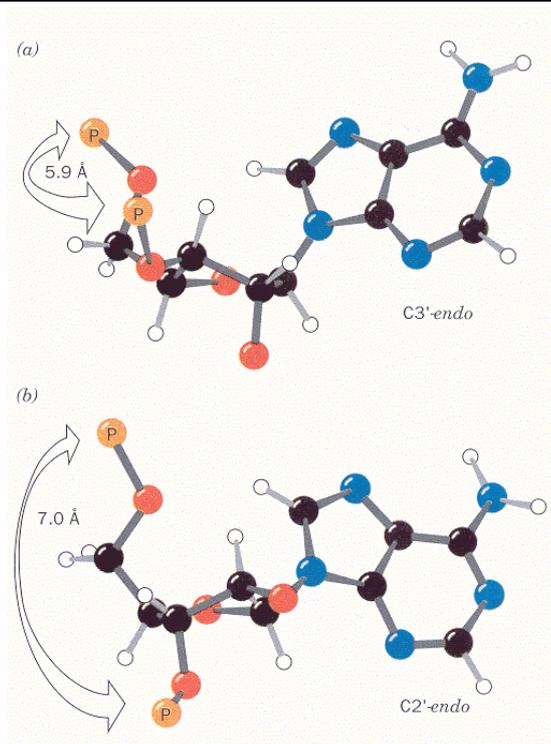


Abbildung 26: Ribose in der C3'-endo und in der C2'-endo-Konformation

Diese Eigenschaften machen die Major Groove der doppelhelicalen RNA unzugänglich für Liganden. Tertiärstrukturen innerhalb der RNA kommen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nucleobasen (nicht Watson-Crick), zwischen Nucleobasen und dem Phosphatrückgrat und zwischen Rückgratresten zustande. Durch Intra- und Interrückgrat Basestacking und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen kommt es zu einer höheren Stabilisierung des RNA-Moleküls als die sekundären Wasserstoffbrückenwechselwirkungen, wie sie normalerweise in DNA gefunden werden. Beispielsweise beinhaltet Hefe tRNA^{Phe} und tRNA^{Asp} eine Anzahl an ungewöhnlichen Basenpaarungen und Basen-Triplett-Wechselwirkungen im Zentrum des Moleküls. tRNA weist ebenfalls ungewöhnliche Faltungen des Zuckers, Phosphat-Sauerstoffs Torsionswinkel und Drehungen und Kettenumkehrungen in der Loopregion, die durch Nucleobase-Phosphat-Wechselwirkungen stabilisiert werden, auf. Man fand heraus, dass die ausgebildeten Strukturelemente wichtige Bindungstellen für natürliche und synthetische Liganden darstellen. Dennoch muss beachtet werden, dass sich durch die Bindung eines Liganden die jeweilige Konformation ändert.^[42]

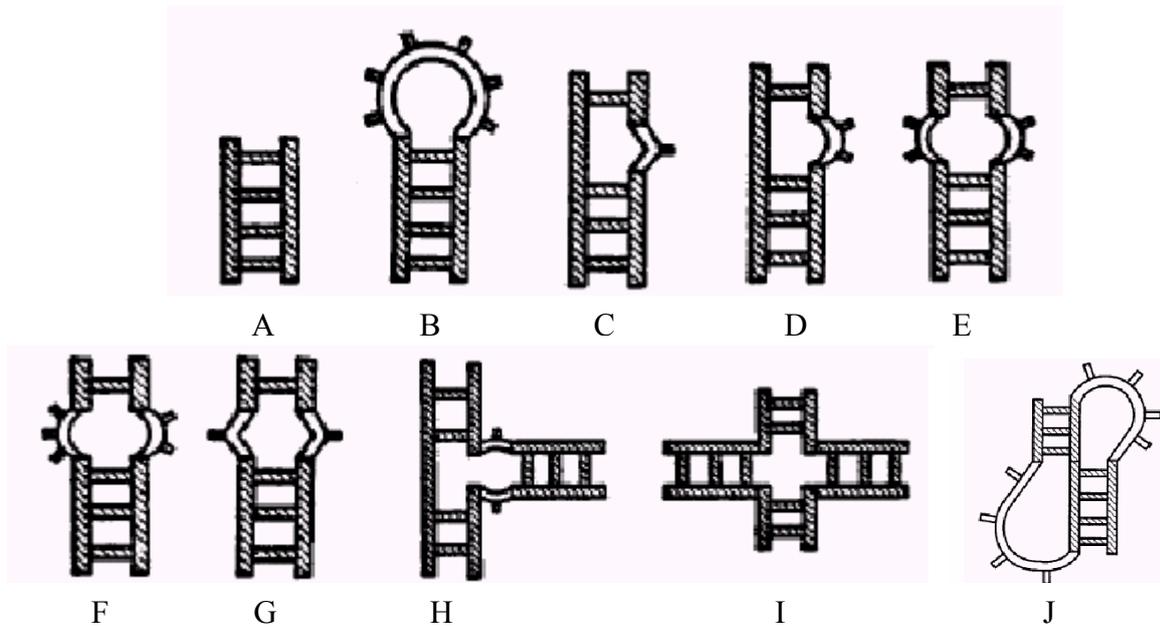


Abbildung 27: Sekundärstrukturen der RNA: Duplex (A), Haarnadelschleife „hairpin loop“ (B), „single base bulge“ (C), „multiple base bulge“ (D), symmetrische interne Schleife (2:2) (E), asymmetrische interne Schleife (3:2) (F), „mismatch loop“ (G), „three stem junction“ (H), „four stem junction“ (I), Pseudoknoten (J)^[42]

Der Nachweis für solche Strukturelemente wurde über eine Röntgenstrukturanalyse und über NMR-spektroskopische Untersuchungen erbracht. Dazu zählen die Sekundärstrukturen, wie der RNA-Pseudoknoten „RNA pseudoknots“, RNA-Haarnadel „RNA-hairpins“, ausgedehnte Schleifen „bulge loops“, Fehlbasenpaarung und Dreistranginteraktionen, wobei Wasserstoffbrückenbindungen die gefaltete Struktur ausmachen. Weeks und Crothers nahmen an, dass Bulges zu einer Öffnung der Major Groove führen, was die Zugänglichkeit und Bindung von kleinen Molekülen und Proteinen erhöht. Schematisch ist ein Pseudoknoten eine Struktur, die aus der Basenpaarung zwischen einem Strang und einem internen Loop und verschiedenen einsträngigen Regionen zustande kommt. Eine solche Struktur ist in die Bindung der Reversen Transkriptase des HIV-1 verwickelt.^[43]

Eine weitere tertiäre Wechselwirkung besteht in der Ausbildung von Dreistranghelices (siehe Abbildungen 18 und 21). Dabei ist neben der Watson-Crick-Basenpaarung auch die Hoogsteen-Basenpaarung beteiligt. Die dritte Nucleobase interagiert dabei mit der großen Furche der Duplexregion.

3.2 RNA-Ligand-Wechselwirkung

Es ist nicht überraschend, dass es viele verschiedene Wege für ein bestimmtes Molekül gibt, um mit der RNA zu interagieren. Nichtkovalente oder reversible Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei Bindungsspezifitäten. Für die Bindung von freien Metallionen und kovalent bindenden Metallkomplexen, wie *cis*-Platin [*cis*-Diamindichlorplatin(II)], wird auf die Literatur von Klug *et al.* verwiesen.^[45] Im Allgemeinen werden nichtspezifische und spezifische Wechselwirkungen weitreichend definiert. Chow *et al.*^[42] definierten nichtspezifische Wechselwirkungen durch einfache oder mehrfache Bindungen an mehreren Stellen der RNA. Spezifische Wechselwirkungen liegen vor, wenn nur eine oder wenige Bindungsstellen des RNA-Liganden vorliegen.

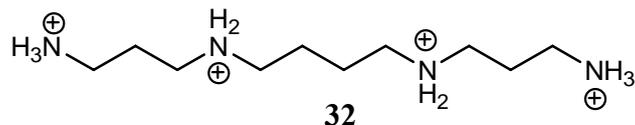
Elektrostatische Effekte zwischen kationischen Molekülen und dem negativ geladenen RNA-Phosphat-Rückgrat sind ideale nichtspezifische Wechselwirkungen. Solche Wechselwirkungen ereignen sich hauptsächlich an der Außenseite der Helix.

Außer an die Außenseite der Helix können auch kleine Moleküle durch Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals-Wechselwirkungen an die Nucleobasen assoziieren. Zugänglich sind die Nucleobasen in einer tiefen Major Groove oder in der weiten und flachen Minor Groove der RNA-Helix.^[1]

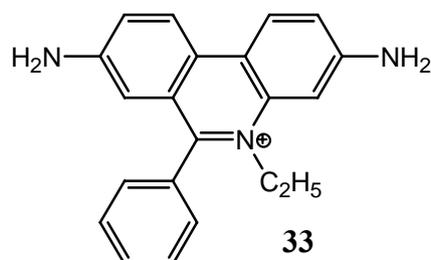
Die elektrostatischen Wechselwirkungen und die Bindung an die Major oder Minor Groove benötigen keine Veränderung in der RNA-Konformation, aber eine Veränderung der RNA-Struktur ist nach Bindung der kleinen Moleküle möglich.

Ein dritter Bindungstyp ist die Interkalation der „stacking“-Wechselwirkung zwischen Nucleobasen und aromatischen Liganden. Eine Interkalation ist hauptsächlich bei der DNA bekannt, wenn ein planarer Heteroaromat sich senkrecht zur Helixachse zwischen die Basenpaaren einschleibt und dort bindet. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Bindungen benötigt man für Interkalation allerdings eine Verzerrung der RNA-Helix.^[42]

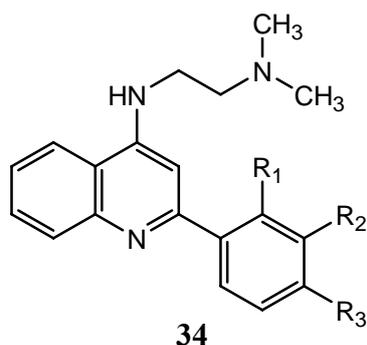
3.2.1 Nicht-spezifische RNA-Ligand-Wechselwirkungen



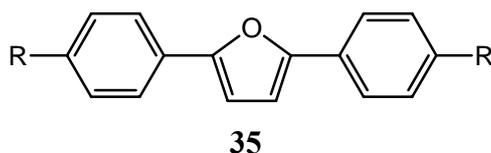
Eines der am frühesten untersuchten kleinen Moleküle, das an RNA bindet, war Spermin (**32**). Das Polyamin (**32**) bildet einen Komplex mit tRNA^{Phe} , der röntgenspektroskopisch untersucht wurde. Das Spermin (**32**) bindet an zwei verschiedenen Stellen an der RNA, die erste ist die Major Groove am Ende des Anticodons und die zweite Bindungsstelle liegt am variablen Loop. Extensive Wasserstoffbrückenbindungen mit der RNA sind ebenso sichtbar wie wichtige elektrostatische Effekte des Polykations (**32**). Durch die positive Ladung kommt es zu einer Verkürzung der Phosphat-Phosphat-Bindung in der Major Groove. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten die dynamischen Wechselwirkungen des Spermin (**32**) und der RNA gezeigt werden. Dabei war zu erkennen, dass die Bindung des Spermins (**32**) die tertiäre Struktur der RNA stabilisiert und die Erkennung der RNA durch Proteine wie Aminoacyl-tRNA-Synthetase unterstützt. In der Natur wird Spermin (**32**) dazu verwendet, dass es elektrostatisch an der Außenseite der Helix oder an der Oberfläche der Major Groove bindet.^[42]



Ein weiteres Beispiel für RNA-Erkennung stellt das Ethidium (**33**) dar, das als DNA-Färbemittel bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass Ethidium (**33**) mit der Hefe tRNA^{Phe} bindet. Es wird daher vermutet, dass das Ethidium (**33**) als planarer aromatischer Farbstoff, wie bei DNA Interkalationsbindungen, eingeht. Durch eine Röntgenstrukturanalyse waren aber solche Interkalationen nicht nachweisbar. Erst durch spätere NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass man mit der ersten Annahme richtig lag. Es wurde nachgewiesen, dass Ethidium (**33**) sowohl interkalative als auch oberflächenbindende Eigenschaften aufweist. Weitere Studien zeigen, dass manche Farbstoffe spezifische RNA-Liganden-Wechselwirkungen aufweisen. Dabei wurde eine Affinität zu RNA-Duplexen, die fehlgepaarte Basenpaaren besitzen oder zu RNA-Helices die einen Bulge ausbilden, beobachtet.^[42]

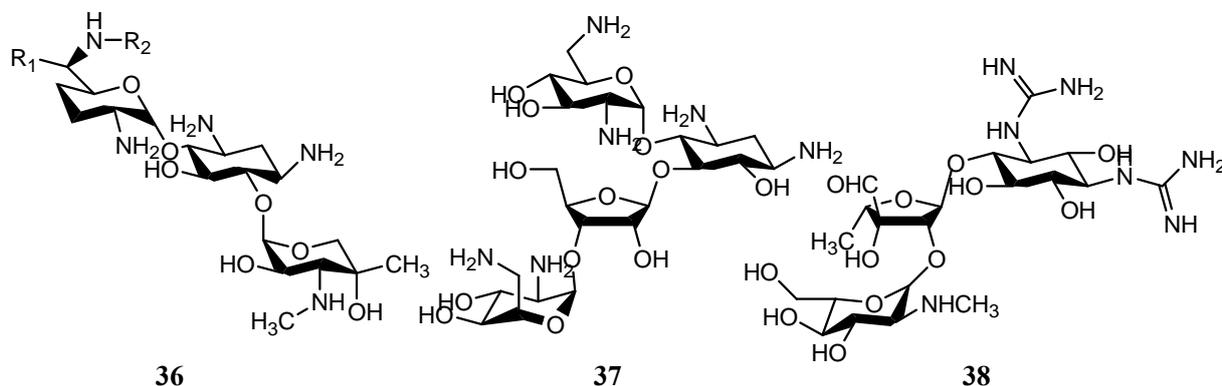


Ein Beispiel für nichtspezifische RNA-Liganden ist das Derivat von 2-Phenylchinolin (**34**). Substituenten an verschiedenen Stellen des Moleküls führen zu unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften wie die Rotationsbarriere, die schließlich die Wechselwirkung zur RNA beeinflusst. Piperazylsubstituenten mit positiver Ladung führten zu Chinolinen, die eine größere Affinität zu RNA besitzen. Man nimmt an, dass diese Analoga durch Interkalationen in Wechselwirkung steht, wobei das Derivat ($R_3 = \text{Piperazyl}$, $R_1 = R_2 = \text{H}$) eine höhere Affinität zu RNA aufweist als das Derivat ($R_2 = \text{Piperazyl}$, $R_1 = R_3 = \text{H}$).^[42]



Zhao *et al.* konnten zeigen, dass kleine Änderungen an den kationischen Substituenten die Bindungseigenschaft und die Affinität des kleinen Moleküls zur RNA drastisch erhöhen können.^[46] In dieser Studie wurden die Wechselwirkungen des Diphenylfurananalogons von Furamidin (**35**) mit RNA untersucht. Die meisten Derivate binden an die RNA-Duplex durch Interkalation und an die Minor Groove der A-T-reichen DNA. Durch die Einführung von Imidazol als Substituent konnten höhere Affinitäten zur RNA festgestellt werden. Es konnte ebenfalls bei diesem Derivat gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen nicht durch Interkalation zustande kamen.^[42]

3.2.2 Aminoglycoside



Antibiotika wechselwirken mit verschiedenen bekannten biologischen Zielstrukturen und unterbinden dabei spezifische zelluläre Prozesse. Eine bestimmte Gruppe der Antibiotika, die Aminoglycoside, binden an bestimmten Stellen des Ribosoms und stören dabei RNA-Funktionen. Die Aminoglycoside, binden an bestimmten Stellen des Ribosoms und stören dabei RNA-Funktionen. Die Aminoglycoside Streptomycin (**38**), Neomycin (**37**) und Gentamicin (**36**) gehören zur Klasse der Aminosucker, die an einem Deoxystreptamin-Ring glycolisiert sind. Die Funktionalitäten der Aminoglycoside bestehen aus Aminen und Hydroxygruppen. Von Neomycin (**37**) weiß man, dass es Wechselwirkungen mit 16S rRNA, 23S rRNA, Gruppe I Intron und dem Hammerhead Ribozym eingeht. Da keine gemeinsame Sequenz gefunden wurde, nimmt man an, dass sie gemeinsame tertiäre Strukturen aufweisen, die einen vergleichbaren Erkennungsmechanismus für die Aminoglycoside darstellt. Die hohe Affinität der Aminoglycoside zur RNA erklärt man sich aus der starren Struktur und der polykationischen Natur der Aminosucker, wobei sich elektrostatische und nichtinterkalative Wechselwirkungen mit der RNA ausbilden.^{[1],[47],[48]} Für die Bindungsaffinitäten zu TAR-RNA siehe 3.2.3.

3.2.3 Liganden für die TAR-RNA

Basierend auf NMR-spektroskopischen Untersuchungen und biochemischen Daten schlug Williamson *et al.* einen TAR-Komplex mit Argininamid (**39**) vor.^[5] Argininamid (**39**) bindet strukturell in gleicher Weise wie das Tat-Protein, so dass es zu einer Konformationsänderung der RNA kommt. F. Aboul-ela *et al.* fanden heraus, dass für die Konformationsänderung der RNA eine 1:1 Stöchiometrie nicht ausreichend ist.^[49]

Bailly *et al.* untersuchten die TAR-Bindungseigenschaften der Verbindung Hoechst 33258 (**40**) und kamen zum Ergebnis, dass sich die Verbindung an die GC-reiche Region an G36-U40 möglicherweise durch Interkalation bindet.^[50]

Mei *et al.* fanden durch Highthroughput Screening *in vitro* zwei Verbindungen, die die Tat-TAR-Wechselwirkung inhibieren können.^[51] Chinoxalin (**41**) und Tetraaminochinoxalin (**42**) wiesen dabei IC₅₀-Werte von 1.3 µM und 10 µM und unterschiedliche Bindungsstellen an der TAR-RNA auf. Chinoxalin (**41**) bindet an der Bulge-Region und Tetraaminochinoxalin (**42**) bindet am 3'-Ende des TAR-Loops. Interessant ist in Bezug auf die beiden Strukturen, dass sie nicht mit typischen Interkalatoren noch aminoglycosidischen Antibiotika verwandt sind.

Hamy *et al.* synthetisierten Antagonisten mit drei verschiedenen Substrukturen:^[52]

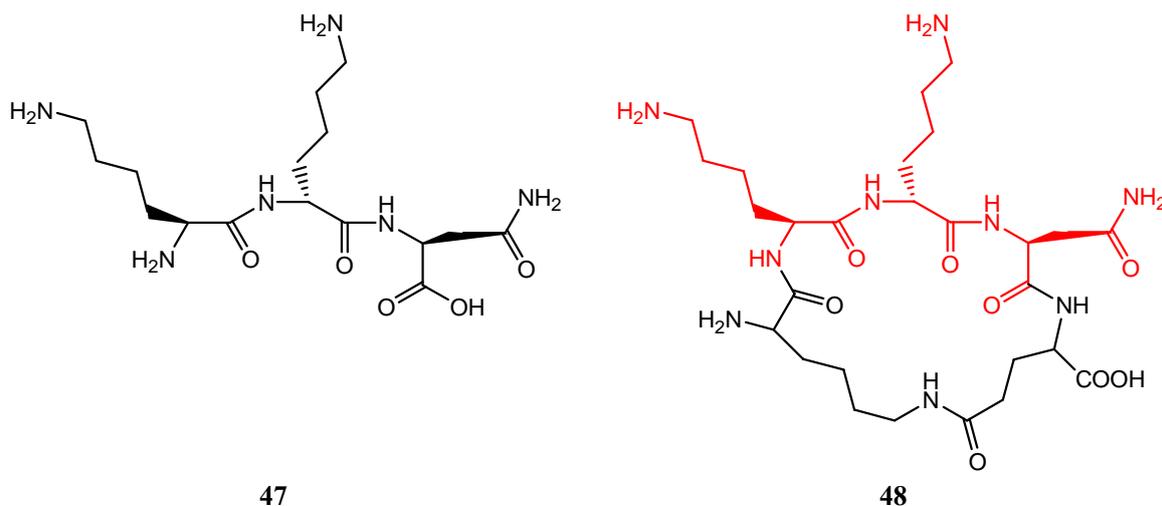
1. Einen aromatischen oder heteroaromatischen Rest mit der Möglichkeit, im Bulge Stacking-Wechselwirkungen einzugehen
2. Kationische Reste, die elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der RNA eingehen können
3. Ein Linker zwischen beiden Resten.

Die wirksamste Verbindung unter diesen Inhibitoren ist CGP 40336A, das einen IC₅₀-Wert von 0.022 µM *in vitro* und 1.2 µM in zellulären Essays aufweist. CGP 40336A (**43**) interagiert dabei mit dem Basenpaar G26-C39 und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Acridin NH-Gruppe und dem N7 des Guanin-Restes aus. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird dabei zwischen der Methoxygruppe von CGP 40336A (**43**) und der Amino-Gruppe des Cytosin-Rests ausgebildet. CGP 40336A (**43**) ist der effektivste TAR-Ligand, der bisher gefunden wurde.

das die Eigenschaft besitzt Tat/TAR-Komplexe im Zellsay bei Konzentrationen von 10–30 μM zu inhibieren.^[53] Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen des Nonamer/TAR-Komplexes stellt man fest, dass es Wechselwirkungen mit dem Bulge eingeht.

Rana *et al.* stellten bei der Untersuchung der Auswirkungen der Stereochemie fest, dass bei verkürzten Analoga des Tat-Proteins mit D- und L-Konfiguration die Stereochemie keine signifikante Rolle spielt.^[54]

In der gleichen Gruppe stellt man sich die Frage, ob auch kurze Peptide, die nicht Tat-verwandte Strukturen besitzen, auch Affinitäten zur TAR aufzeigen. Dazu wurden durch kombinatorische Bibliotheken Tripeptide aus L- und D-konfigurierten Aminosäuren synthetisiert. Die besten Affinitäten wurden dabei bei den Tripeptiden $\text{NH}_2\text{-(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn-OH}$ (**46**) ($K_D = 0.42 \mu\text{M}$) und $\text{NH}_2\text{-(D)Thr-(D)Lys-(L)Asn-OH}$ ($K_D = 0.56 \mu\text{M}$) gefunden. Es scheint, dass die bevorzugte Sequenz X-Lys-Asn ist. Die Diastereomere der Tripeptide zeigen eine niedrigere Affinität zu TAR-RNA, was darauf schließen lässt, dass die Stereochemie in Bezug auf die Selektivität eine Rolle spielt. Diese Ergebnisse konnten innerhalb des SFB 579 RNA-Liganden-Wechselwirkung nicht reproduziert werden.



Die Untersuchungen in Zellkulturen (HL3T1) des Tripeptids $\text{NH}_2\text{-(L)Lys-(D)Lys-(L)Asn-OH}$ (**46**) auf die Unterdrückung der Tat-vermittelten Transkriptionsaktivität erbrachte einen IC_{50} -Wert von 0.05 μM . Aus dem Einbau dieser Tripeptidstruktur in cyclische Peptide resultierte das Pentapeptid (**47**), das in Zellkulturen einen vergleichbaren IC_{50} -Wert von 0.04 μM besitzt.^[47]

Aminoglycoside können die Tat-Peptid-TAR-Wechselwirkung inhibieren. Dazu wurden mit den drei oben genannten Aminozuckern elektrophoretische Mobilitätsshift-Assays durchgeführt. Dabei zeigte sich im Ergebnis, dass die Affinität zur TAR nicht von der Anzahl der positiven Ladungen abhängt, da Streptomycin (**38**) eine fünffach höhere Affinität aufweist

als Gentamicin (**36**). Die größte Affinität der drei Aminoglycoside zur TAR-Sequenz zeigt das Neomycin (**37**) auf. Basierend auf Computerexperimenten, biochemischen Daten und NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde für Neomycin (**37**) eine andere Bindungsstelle an TAR-RNA gefunden als für das Tat-Peptid. Neomycin (**37**) inhibiert die Tat-TAR Assoziation in einer nicht-kompetitiven Weise durch Fixierung der freien Protein Konformation.^[47]

Tabelle 2: Affinität von Aminoglycosiden an TAR-RNA

Aminoglycosid	IC50 [μ M]	Positive Ladung
Neomycin (37)	0.92 \pm 0.09	6
Gentamicin (36)	45 \pm 4	5
Streptomycin (38)	9.5 \pm 0.8	3

3.3 Tat/TAR-Komplex

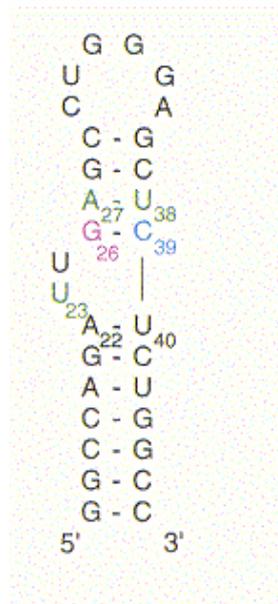


Abbildung 29: Sequenz der TAR-RNA

TAR ist eine RNA-Sequenz am 5'-Ende des HIV-1 Transkriptes, bestehend aus 59 Nucleobasen. TAR-RNA ist eine Haarnadelstruktur. Dabei werden zwei helicale Regionen durch einen aus drei Nucleotiden bestehenden Bulge getrennt. Der Bulge dient dem Tat-Protein als Erkennungsstelle, wobei Rana *et al.* herausfanden, dass nur U23 in der Bulge-Region dem Protein als Erkennungsstelle dient.^[54] Die beiden restlichen Basen C24 und U25 sind dabei nur „Spacer“ und können durch jede andere Nucleobase ersetzt werden. Einen

weiteren Beitrag zur Bindung des Proteins ergibt sich aus den vier Basenpaaren, die den Bulge flankieren. Die Haarnadelschleife ist essenziell für die Transaktivierung und Bindung des CyclinT1/Tat-Komplexes. Das Tat-Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen. Eine Region ist für die Wechselwirkung der Transkriptionsprozesse der Wirtszelle zuständig. Die zweite -hauptsächlich aus basischen Aminosäuren bestehende Region- ist verantwortlich für den Transport in den Nucleus und für die Bindung an die TAR-RNA. Die Sequenz der TAR-RNA ist hochkonserviert, da Mutationen sofort die Transkriptionsrate des Retrovirus erheblich erniedrigen würde. Daher ist TAR-RNA ein vielversprechendes drug target.^[55]

3.4 Biologische Funktion der RNA

Die Unterscheidung der verschiedenen RNAs geschieht durch deren Funktionen.

Die ribosomale RNA (rRNA) wird bei Eukaryonten im Zellkern synthetisiert und ist neben den ribosomalen Proteinen Bestandteil der Ribosomen. Sie sind damit an der Biosynthese von Proteinen (Translation) beteiligt.

Die messenger RNA (mRNA) überbringt die genetische Information für Proteine zu den Ribosomen, wo durch Translation eines Basentriplets die entsprechend codierte Aminosäure zum entstehenden Protein angelagert wird. Die mRNA wird im Cytoplasma schnell durch RNase wieder in ihre einzelnen Nucleotide gespalten. Durch Steuerung der Synthese und des Abbaus der mRNA besitzt die Zelle die Möglichkeit der Regulation der Genexpression.

Die transfer RNA (tRNA) dient bei der Translation als Transport- und Adapter-Molekül. Die tRNA besitzt das Anticodon zum Codon der mRNA, mit der die tRNA in Wechselwirkung steht. Durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase wird die Aminosäure, die durch das jeweilige Anticodon der tRNA codiert ist, an die freie 3'-Hydroxy-Gruppe angehängt.^[43,44]

Aufgrund der Eigenschaften der Informationsspeicherung und Katalyse der RNAs nimmt man heute vielfach an, dass sich die RNA bereits vor den Proteinen und der DNA als biologisch funktionelles Makromoleküle entwickelt haben könnte.^[55]

3.5 Lebenszyklus des human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

Der Lebenszyklus des HIV-1 beginnt mit der Zelladhäsion der Wirtszelle, der Fusion und dem teilweisen Verlust des Capsids. Replikation von HIV-1 ereignet sich durch einen mehrstufigen reversen Transkriptionsprozess, in dem das einsträngige virale RNA-Genom in ein doppelsträngiges provirales DNA Intermediat konvertiert wird, um in die Wirtschromosomen eingebaut zu werden. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase der Wirtszelle benutzt dabei die Virus-RNA als Matrize und stellt eine DNA-Kopie her. Diese Reaktion ist eine Umkehr des normalen Transkriptionsprozesses. Deshalb wird die virale Polymerase auch als reverse Transkriptase bezeichnet. Die reverse Transkriptase benutzt die zelluläre $tRNA^{Lys}$, die an der Primer Bindungsstelle (PBS), einer 18-Nucleotide langen Sequenz nahe dem 5'-Ende der untranslatierten Region (U5) der viralen RNA, gebunden ist, als Primer. Im Aufbauprozess des Virus werden verschiedene zelluläre tRNAs an die PBS gebunden. Dennoch wird nur $tRNA_3^{Lys}$ als Primer benötigt. Mutanten des Retrovirus, die andere reverse Transkriptionsprimer benutzten, zeigen reduzierte Effizienz der Replikation und Rückmutation zum Wildtyp aus. Nach dem Einbau der doppelsträngigen DNA in das Wirtschromosom wird die virale DNA transkribiert.

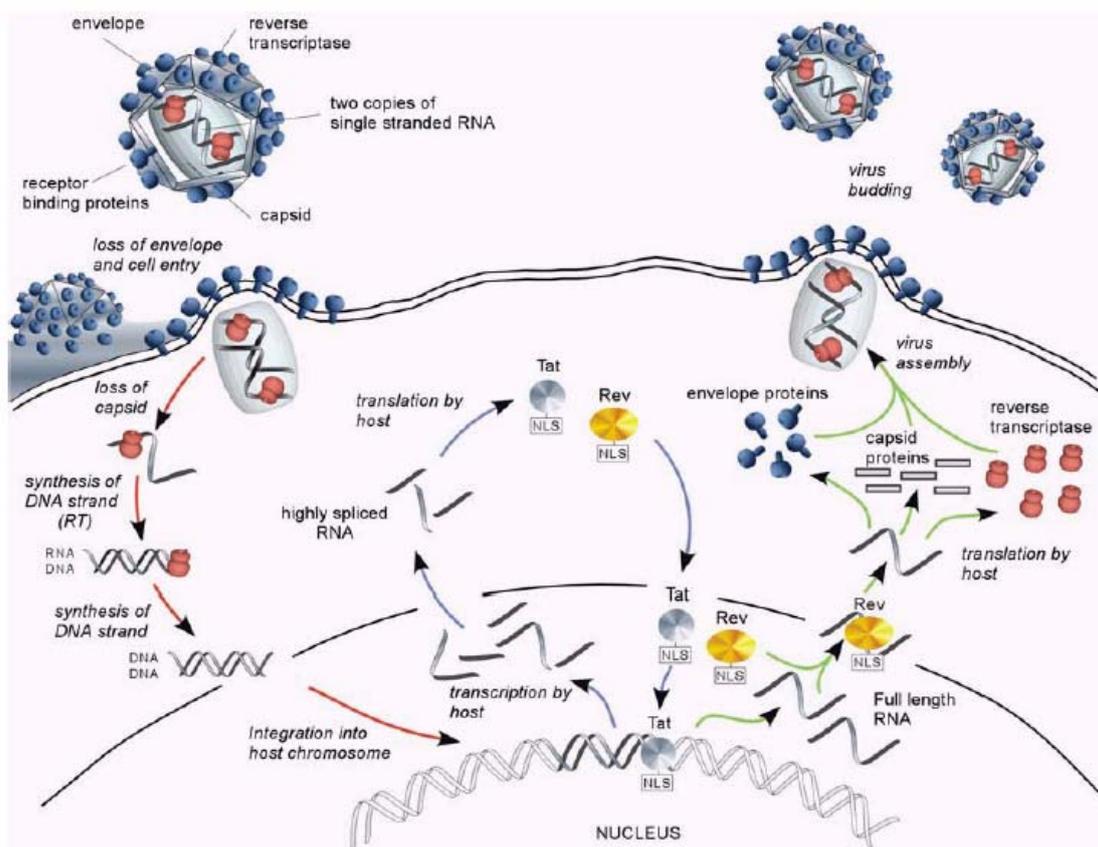


Abbildung 30: Lebenszyklus von HIV-1 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Weizman)^[49]

Hauptsächlich werden in der frühen Phase der Replikation nur kleine RNA-Transkripte repliziert oder die längeren Transkripte werden gespliced. Diese relativ kurzen RNA-Sequenzen gelangen vom Kern in das Cytoplasma, wo aus ihnen die regulativen Proteine Tat und Rev exprimiert werden. Tat bindet im Kern an die TAR-RNA, die am 5'-Ende des neuentstandenen viralen Transkripts lokalisiert ist. Diese Bindung erhöht die Prozessivität der Polymerisationsreaktion und erhöht beträchtlich die Bildung von viraler RNA in voller Länge. Durch Bindung von Rev an das RRE (Rev response element) bildet sich ein Aggregat, das es der RNA ermöglicht, aus dem Zellkern auszutreten und vor dem zelleigenen Spliceprozess geschützt zu sein. Im Cytoplasma werden die viralen Proteine exprimiert und alle viralen Komponenten werden zum neuen Virus vereint.^{[44], [43], [48]}

4 Methoden zur Quantifizierung von Komplexstabilitäten von RNA-Liganden

4.1 Methoden über radioaktive Markierung

Um die Bindungsaffinitäten der RNA-Liganden zur TAR-RNA zu messen, gibt es einige traditionelle Methoden, basierend auf radioaktiv markierten Proben. Eine solche Methode ist die radioaktive ^{32}P -Markierung von TAR, wobei die RNA in eine Mischung von Tat und RNA-Ligand gegeben wird. Die Mischung wird über einen Nitrocellulose-Membran abfiltriert, die Tat und Tat/TAR-Komplexe zurückhält. Freie RNA geht dabei durch den Filter. Durch Messung der Radioaktivität der Membran und des Filtrats kann die Menge der gebundenen und ungebundenen RNA bestimmt werden. RNA-Liganden mit einer hohen Affinität zu TAR-RNA erniedrigen dabei die Radioaktivität der Membran.^[51]

Mit radioaktiver TAR-RNA wird auch im elektrophoretischen mobility shift assay gearbeitet. Dabei wird eine Mischung von Tat, TAR-RNA(^{32}P) und RNA-Ligand gegen TAR-RNA(^{32}P) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Lauflänge des Tat/TAR-Komplexes ist im Gegensatz zu freier TAR und TAR/RNA-Ligand-Komplex erniedrigt.^[51]

In einer weiteren Methode wird ein Harz verwendet, in das ein Scintillat eingebettet ist und das mit einer biotinylierten TAR-RNA beladen ist. Der Ansatz wird mit radioaktiv markiertem Tat-Peptid(^{125}I) inkubiert. Durch Bindung von Tat kommt die radioaktive Markierung in die Nähe des Harzes bzw. des Scintillats, was zu einer Lichtemission führt. Durch Zugabe des RNA-Liganden in verschiedenen Konzentrationen ermöglicht eine Quantifizierung deren Affinität zu TAR-RNA.^[56]

4.2 Elektronen paramagnetische Resonanzspektroskopie (EPR)

Durch Elektron paramagnetische Resonanzspektroskopie kann ebenfalls die Affinität von RNA-Liganden zu TAR-RNA bestimmt werden. Dazu führte man Nitroxid Spinlabels an die 2'-OH-Gruppe der Uracile in der Nähe der Bulge-Region der TAR-RNA ein. Mit Bindung eines RNA-Liganden treten charakteristische Veränderungen der Signalform auf. Durch Vergleich mit aus weiteren Methoden gewonnenen Daten ist es möglich, vergleichbare Bindungsarten zu unterscheiden.^[57]

4.3 Fluoreszenzspektroskopie/FRET

Die Methode, die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendet wurde, ist der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Hamasaki *et al.*^[58] veröffentlichten einen solchen Assay, indem sie ein 16-mer Tat-Peptid synthetisierten, das an seinen Enden mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen gelabelt wurde.

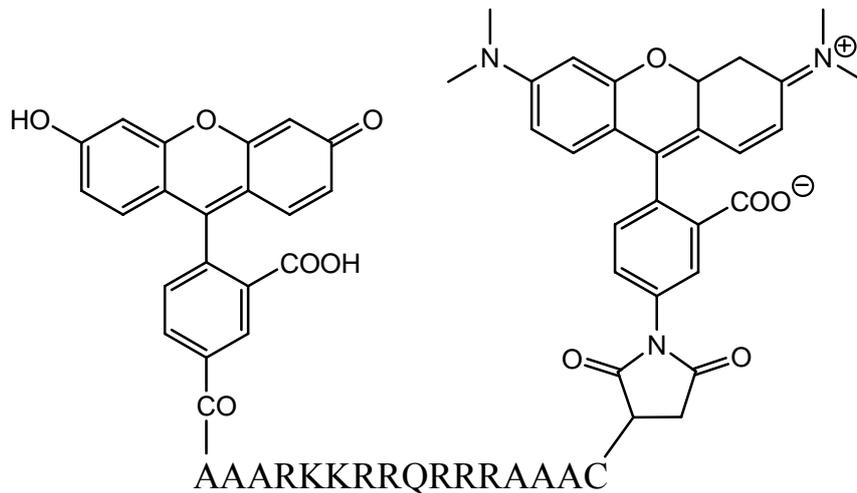


Abbildung 31: Tat-Peptid (FtatRhd), das an seinen Enden mit Donor- und Akzeptorfarbstoffen gelabelt wurde

Es wurde erwartet, dass durch die Bindung von Tat an TAR Strukturänderungen auftreten. Als Weiteres stand fest, dass Fluorescein, Rhodamin und Cyanin in wässriger Lösung Dimere bilden, die Fluoreszenzquenching verursachen und dass Fluorescein und Tetramethylrhodamin als gut charakterisierte Kombination zur Entstehung von FRET bekannt sind, wenn sie einen bestimmten Abstand zueinander einnehmen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein 16-mer Tat-Peptid FtatRhd synthetisiert, das die Tat₄₉₋₅₇-Sequenz beinhaltet. Fluorescein befindet sich am N-Terminus und Tetramethylrhodamin am C-Terminus. Um unbeabsichtigte Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen und der RNA zu vermeiden, wurde zusätzlich drei Alanin-Reste an beiden Enden eingeführt. Zusätzlich wurde für die Kupplung des Rhodamins an den C-Terminus noch ein Cystein angehängt.

Wenn die Lösung von FtatRhd (100 nM) am Absorptionsmaximum von Fluorescein (500 nm) angeregt wurde, kann man Fluoreszenzemission in Doppelpeaks bei 528.5 und 577 nm beobachten. Allgemein werden die zu untersuchenden Moleküle bei der Fluoreszenzspektroskopie durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Das emittierte Licht ist die Fluoreszenz, die aus der Relaxation der sich im 1. angeregten Singulettzustand befindlichen Elektronen resultiert. Die Differenz der beiden resultierenden Wellenlängen lässt sich durch den Stokes-Shift erklären^[59]. Dabei bietet das FRET-Verfahren den Vorteil, dass die Streuung

des emittierenden Lichtes vermieden wird. Wegen der Flexibilität des Tat-Proteins ist es möglich, dass sich intramolekular ein Dimer aus dem Donor- und Akzeptorfarbstoff ausbildet, so dass durch den resultierenden Energietransfer der angeregten Zustände der Farbstoffe die Fluoreszenzemission von FtatRhd stark gequenchet wird. Das intramolekulare Quenchen ist mit einer schwachen Emission gleichzusetzen. Die Bindung von FtatRhd an TAR-RNA führt zur Dissoziation des intramolekularen Dimers der Farbstoffe, wobei durch die Distanz der beiden Farbstoffe die Fluoreszenzemission des FRET stattfindet.

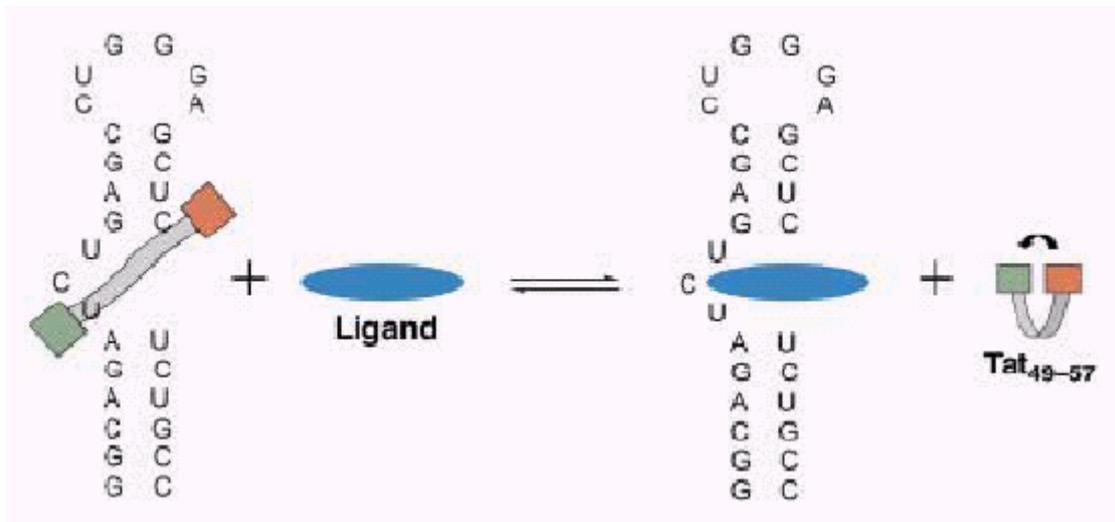


Abbildung 32: Schema der Verdrängung der FtatRhd von der TAR-RNA durch den RNA-Liganden

Die Emission von FtatRhd wächst durch Hinzugabe von TAR-RNA bei 528.5 nm und nimmt bei 577 nm dramatisch zu. Durch die Zugabe eines Überschusses TAR-RNA kommt es zu einer 2.7-fachen Zunahme der Fluoreszenzemission als ohne TAR-RNA (siehe Abbildung 33).

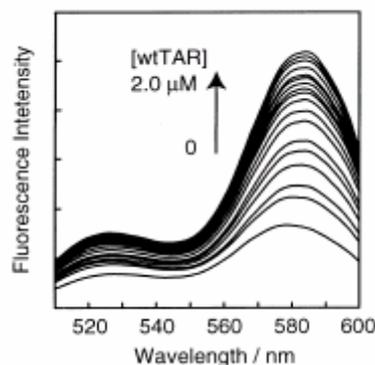


Abbildung 33: Fluoreszenzemissionsspektrum von FtatRhd in der Abwesenheit und Präsenz von TAR-RNA (wtTAR) bei verschiedenen Konzentrationen.

Die Anisotropie der Fluoreszenz von FtatRhd ändert sich nicht durch die Addition von TAR-RNA. Dies zeigt an, dass die Rotation der Farbstoffe, sogar im Komplex mit TAR-RNA, relativ frei erfolgt.

Die Dissoziationskonstante K_D von FtatRhd und TAR-RNA kann aus der Auftragung der 577 nm-FRET-Emission des FtatRhd gegen die TAR-RNA-Konzentration bei konstanter Konzentration von FtatRhd ermittelt werden. Für den Fall, dass der RNA-Ligand und der FtatRhd/TAR-RNA-Komplex im Verhältnis 1:1 vorliegt, gilt folgende Gleichung:

$$I = I_0 + \frac{\Delta I}{2} ([RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D - \sqrt{([RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D)^2 - 4[RNA]_0 \cdot [FtatRhd]_0})$$

Dabei stellen I und I_0 die Fluoreszenzintensitäten von FtatRhd in der Anwesenheit und Abwesenheit von RNA dar. ΔI ist die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität von FtatRhd in Anwesenheit einer unendlichen Konzentration an RNA und der Abwesenheit von RNA. $[RNA]_0$ und $[FtatRhd]_0$ sind die jeweiligen Konzentrationen zu Beginn der Reaktion.

Durch die Zugabe von Tat-Peptid als RNA-Ligand zu dem TAR-RNA/FtatRhd-Komplex kommt es zur drastischen Abnahme der Fluoreszenz bei zunehmender Konzentration des RNA-Liganden. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass durch die Zugabe des RNA-Liganden das Gleichgewicht auf die Seite des intramolekularen Dimers verschoben wird. Dieser bildet sich aus dem Donor- und Akzeptorfarbstoff, bei dem die Fluoreszenz des FRET gequenched wird.

Somit ist es möglich durch Fluoreszenzemission RNA-Liganden zu finden, die das Tat-Peptid aus der TAR-RNA verdrängen können.^[58]

Für die in der vorliegenden Diplomarbeit gemessenen RNA-Liganden konnten keine K_D -Werte ermittelt werden, da keine exakten RNA-Konzentrationen bekannt waren. Die verwendete RNA-Probe war nur durch Standardmethoden aufgereinigt worden.

5 Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese basiert auf einer sequenziellen Addition von Aminosäuren und Aminosäuren mit geschützten Seitenketten zu einem unlöslichen Polymerträger. Die säurelabile Boc-Schutzgruppe oder die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe werden zur Schützung des N-Terminus benutzt. Nach Abspaltung der Schutzgruppe wird die nächste N-terminal geschützte Aminosäure hinzugegeben, wobei entweder ein Kupplungsreagenz oder ein voraktiviertes Aminosäurederivat die Kupplung vollzieht. Das resultierende Peptid ist am Harz über einen „Linker“ durch seinen C-Terminus befestigt. Bei der Abspaltung vom Harz entsteht eine Peptidsäure oder ein Amid, was vom Linker-Typ abhängt. Die Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren werden oft danach gewählt, dass sie simultan zusätzlich während der Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz ebenfalls abgespalten werden.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe geschieht über Trifluoressigsäure (TFA) und die der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit Piperidin. Für die abschließende Abspaltung des Peptids vom Harz und die Entschützung der Seitenketten benötigt man bei der Anwendung der Boc-Strategie, der nach R. B. Merrifield durchgeführten Festphasenpeptidsynthese, starke Säuren wie Fluorwasserstoff (HF) oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA).^[60] Bei Anwendung der Fmoc-Strategie von R. Sheppard *et al.* wird dafür TFA verwendet.^[61]

Dichlormethan (DCM), N,N'-Dimethylformamid (DMF) und Dimethylacetamid (DMA) sind die primären Solventien, die für die Entschützung des Harzes, dessen Kupplung und dessen Waschschrte verwendet werden.

Eine Peptidsynthese kann schubweise oder kontinuierlich erfolgen, wobei bei der ersten Methode das Peptidharz in einem mit einem Filter ausgestatteten Reaktionsgefäß aufbewahrt wird und die Zugabe und die Entnahme von Reagenzien unter manueller oder Computerkontrolle geschieht. Bei der kontinuierlichen Peptidsynthese befindet sich das Harz in einer Säule, durch die Reagenzien und Lösungsmittel kontinuierlich unter manueller oder automatischer Kontrolle geleitet werden. Eine Reihe von kommerziell erhältlichen manuellen, semiautomatischen oder automatischen Synthesizer sind für beide Methoden entwickelt worden.^[60]

5.1 Gegenüberstellung Boc- und Fmoc-Strategie

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe benötigt TFA, das zur Zersetzung von einigen sensiblen Peptid-Bindungen, sowie säurekatalysierten Nebenreaktionen führen könnte. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt dagegen durch Piperidin, einer milden Base. TFA wird nur für die Abspaltung vom Harz und zur Entschützung einiger Peptid-Harze verwendet. Für diesen Prozess wird nach der Boc-Strategie nach Merrifield Fluorwasserstoff verwendet.^[62]

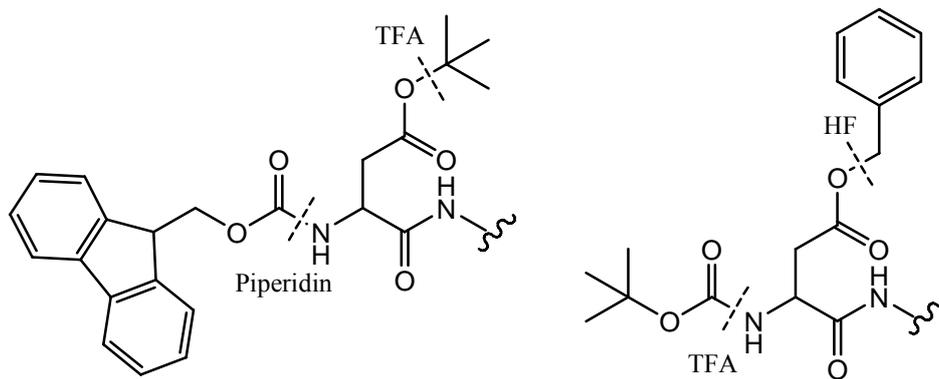


Abbildung 34: Schutzgruppenstrategie in der Festphasenpeptidsynthese

5.2 Harze für die Festphasenpeptidsynthese^[60]

Wang-Harz (HMP-Harz) wird aus Chlormethylpolystyren, dem Merrifield-Harz, das durch 4-Hydroxybenzylalkohol modifiziert wurde, dargestellt. Nach Abspaltung des fertigen Peptides vom Harz liegt dieses als freie Säure vor.

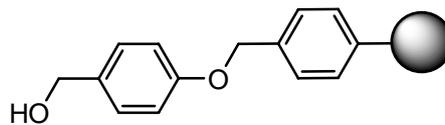


Abbildung 35: Wang-Harz

Das säurelabile Rinkamid-Harz wird erfolgreich bei der Synthese von Peptidamiden angewendet. Die Knüpfung zwischen dem Linker und der Aminosäure erfolgt über eine Amidbindung. Abspaltbedingung für das Harz ist 95 %ige TFA.

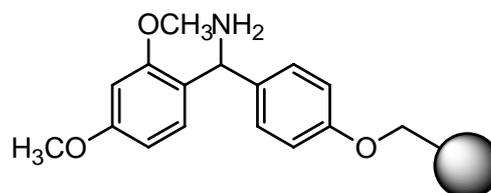


Abbildung 36: Rinkamid-Harz

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Peptidsynthese das Rinkamid-MBHA-Harz verwendet. Dieses Harz besteht aus 4-Methylbenzhydrylaminpolystyren. Norleucin dient dabei als Verbindung zwischen dem Polystyrenharz und dem modifizierten Fmoc-geschützten Rinkamid-Linker. Die Abspaltung dieser Festphase erfolgt mit TFA, wobei das synthetisierte Peptid als ein Peptidamid abgespalten wird.

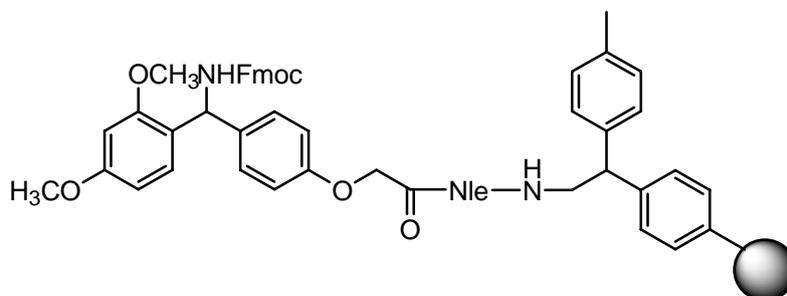


Abbildung 37: Rinkamid-MBHA-Harz

Das Rinksäure-Harz ist sehr säurelabil, so dass im sauren Milieu das Risiko besteht, dass es zum Verlust von Peptid kommt. Die Aminosäure wird über eine Esterfunktion an den Linker gekuppelt. Nach dem Abspalten des fertigen Peptides erhält man die freie Carbonsäure.

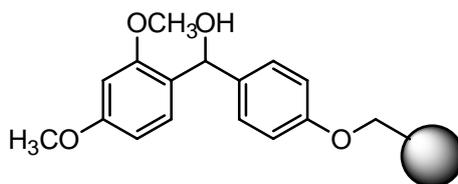


Abbildung 38: Rinksäure-Harz

5.3. Kupplungsmethoden

Vor der Kupplung der Aminosäure an den polymeren Träger muss diese aktiviert werden. *In situ* Aktivierung ist aufgrund der einfachen Handhabung, der schnellen Reaktion ohne Nebenreaktionen die Methode der Wahl. Die weitverbreitetsten Kupplungsreagenzien sind DCC, DIC/HOBt, EDC/HOBt, BOP, PyBOP[®], TBTU und HBTU. Als BOP-Ersatz wird PyBOP[®] verwendet, da BOP sich zu Hexamethyltriaminophosphin (HMPA) einem potenziellen Mutagen zersetzt, das in Deutschland auch nur unter Sicherheitsvorkehrungen eingesetzt werden darf. HOBt-Ester von geschützten Aminosäuren werden leicht *in situ* gebildet und reagieren in den meisten Fällen sehr schnell. Die Kupplungseffizienz und Kupplungsrate der einzelnen HOBt-Ester wurde untersucht und es ergab sich folgender Trend: BOP/HOBt > DIC/HOBt.^[60]

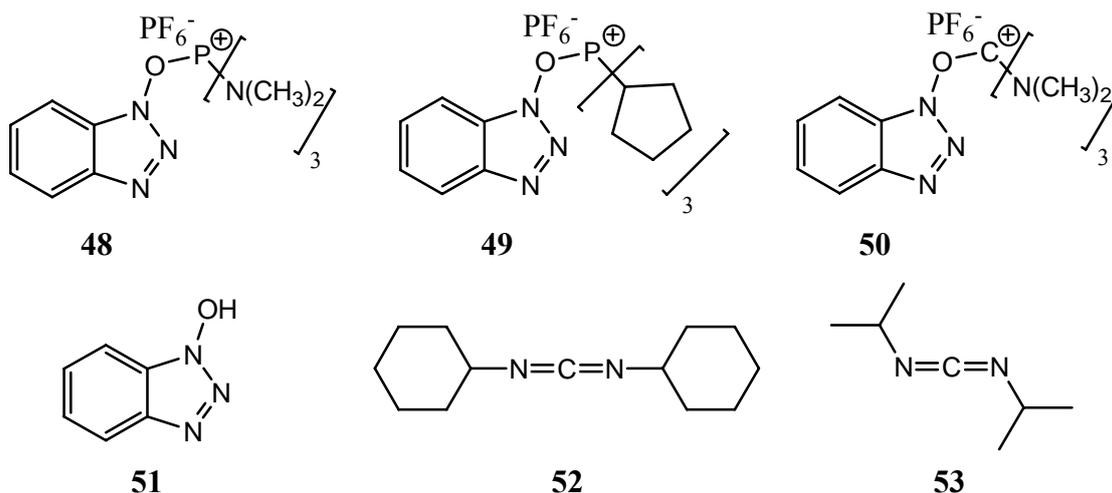


Abbildung 39: BOP (48), PyBOP[®] (49), HBTU (50), HOBt (51), DCC (52), DIC (53)

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde DIC/HOBt als Kupplungsreagenz verwendet. Dabei wird die Carbonsäure (54) *in situ* durch DIC (53) aktiviert. Dadurch entsteht ein O-Acylisoharnstoff (55), der sich mit einem Nucleophil, im Falle der Peptidsynthese einem Amin (56), zum Peptid (57) umsetzt. Um die Nebenreaktion der Umlagerung des O-Acylisoharnstoff (55) zum inaktiven N-Acylharnstoff (58) zu vermeiden, wird HOBt (51) als Additiv der Reaktion zugesetzt (siehe Abbildung 41).

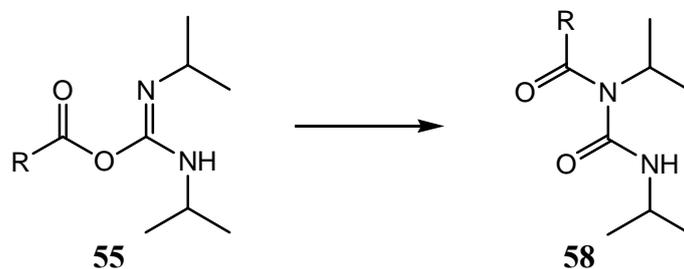


Abbildung 40: Umlagerung des O-Acylisoharnstoff (55) zum inaktiven N-Acylharnstoff (58)

Das HOBt (51) reagiert mit dem O-Acylisoharnstoff (55) zum Benzotriazolester (59), der schließlich mit der freien Aminogruppe der festen Phase reagiert.^[63]

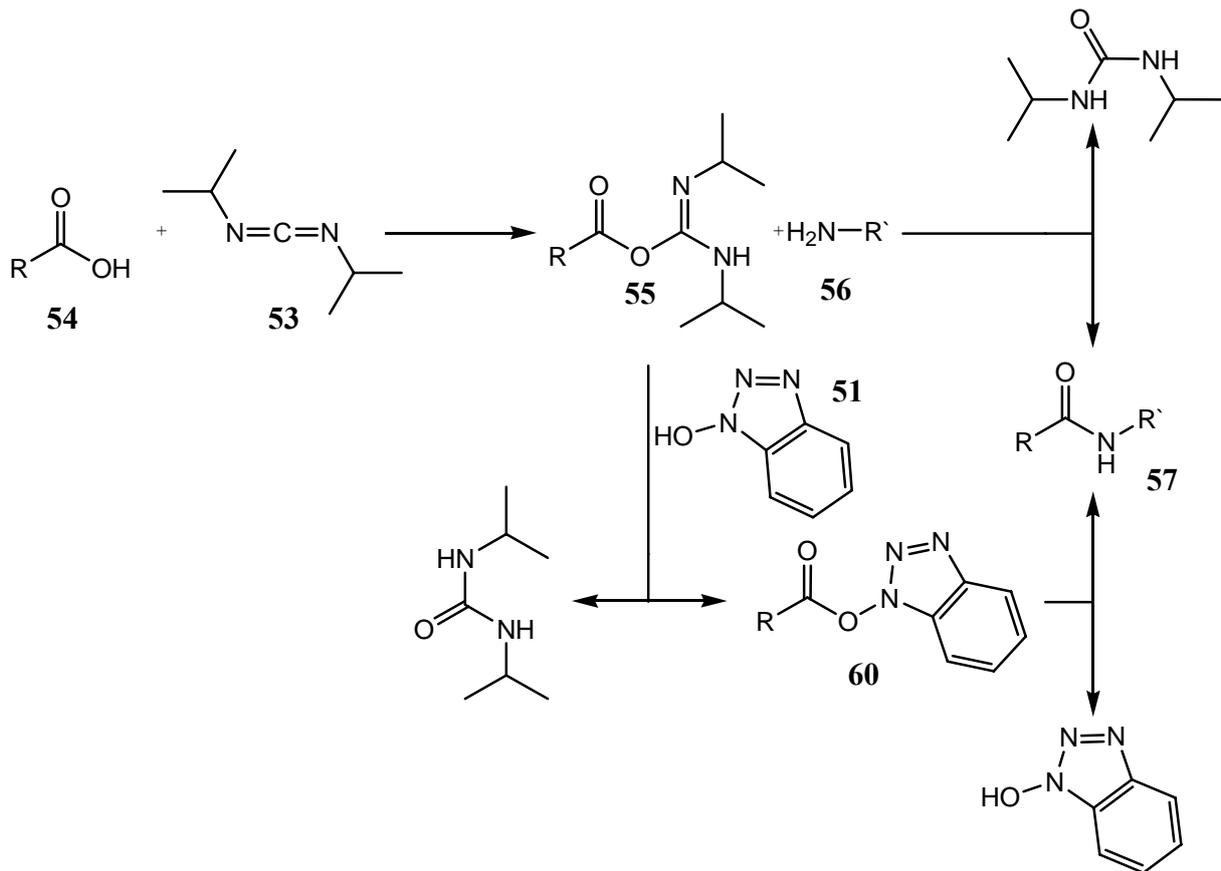


Abbildung 41: Carbonsäureaktivierung mit DIC zum O-Acylisoharnstoff (55) und Umesterung des Aktivesters zum Benzotriazolester (60), wobei beide Wege zum Peptid (57) führen.

5.4 Lösungsmittel

In der Fmoc-Strategie ist N-N'-Dimethylformamid (DMF) das Lösungsmittel der Wahl. Dimethylacetamid (DMA) ist ein Analogon zu DMF und kann auch in der Festphasenpeptidsynthese verwendet werden. Das dritte mögliche Lösungsmittel ist N-Methylpyrrolidon (NMP), das gute Lösungseigenschaften besitzt und die Kupplungsrate am Harz erhöhen kann. Die Schwierigkeit bei NMP liegt in der Gewinnung des Lösungsmittels in reiner Form.

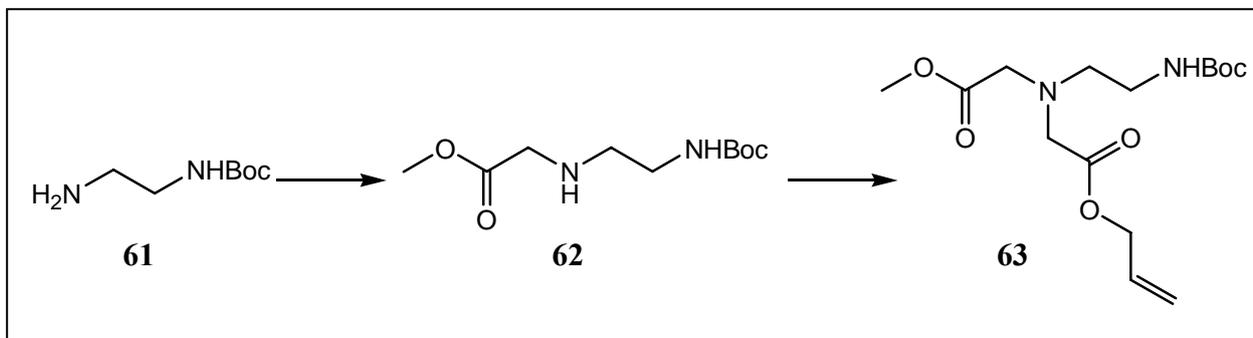
5.5 Abspaltung vom Harz und Entschützung

Vor der Abspaltung muss das Harz möglichst gereinigt und trocken vorliegen. Für Peptide, die kein Arginin, Cystein, Tyrosin, Methionin und Tryptophan enthalten, ist eine 95 % TFA-Lösung in Wasser das Abspaltreagenz der Fmoc-Strategie. Wenn jedoch eine der oben genannten Aminosäuren in der Sequenz vorhanden ist, ist es unbedingt erforderlich, einen

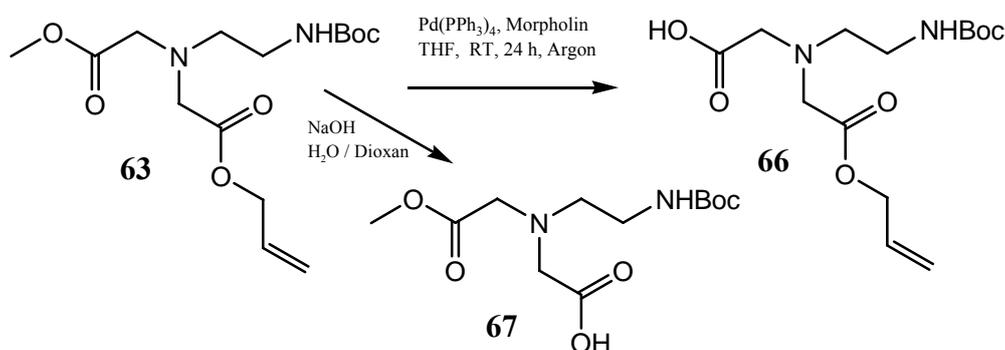
Scavenger oder eine Reihe von Scavengern zu der TFA-Lösung hinzugeben. Als Scavenger eignen sich beispielsweise Thioanisol oder Ethandithiol. Sie sind in der Lage, die abgespaltenen Schutzgruppen abzufangen, so dass mögliche S_E -Reaktionen an Aromaten unterbunden werden.^[60]

6 Eigene synthetische Arbeiten

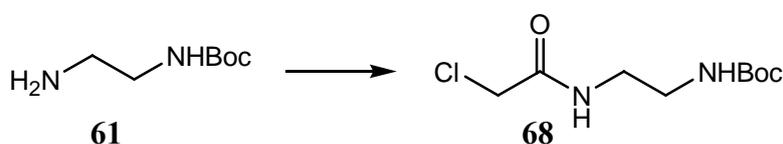
6.1 Versuch zum Aufbau eines neuartigen Grundgerüsts



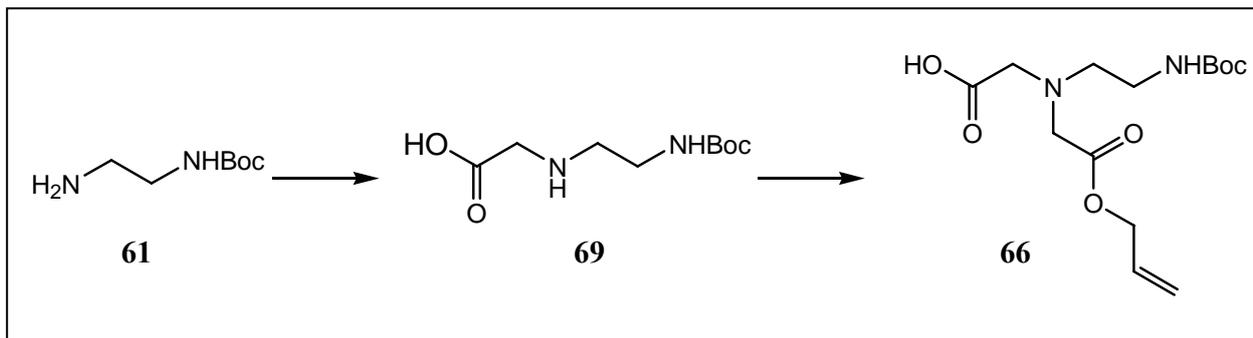
In der ersten Syntheseplanung war vorgesehen, dass N-(2-Aminoethyl)-carbamidsäure-*tert*-butylester (**61**) und Chloressigsäuremethylester zum Methylester (**62**) reagiert. Vom Ester (**62**) aus sollte durch die Zugabe von Allylchloroacetat (**64**) bzw. Allylbromoacetat (**65**) der Allylester (**63**) gewonnen werden. Durch Allyl-Schutzgruppen-Abspaltung mit Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und Morpholin wäre die Carbonsäure (**66**) entstanden, mit der man jedes Molekül mit Aminofunktionalität durch DCC und HOBt hätte kuppeln können. Die Carbonsäure (**67**) wäre auch vom Methylester (**63**) aus durch die Abspaltung der Methyl-Schutzgruppe durch eine Verseifung mit Natriumhydroxid in einem Wasser/Dioxan Gemisch zugänglich gewesen.



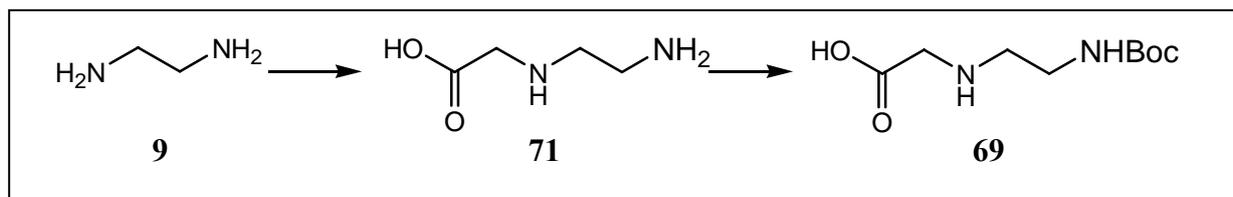
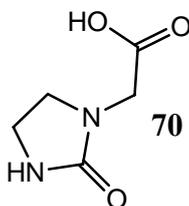
Der Versuch, aus N-Boc-ethylendiamin (**61**) mit Chloressigsäuremethylester und der Hilfsbase Triethylamin in Toluol bei 80 °C den Methylester (**62**) zu gewinnen, scheiterte, da nach der säulenchromatographischen Aufreinigung ausschließlich das Amid (**68**) isoliert werden konnte.



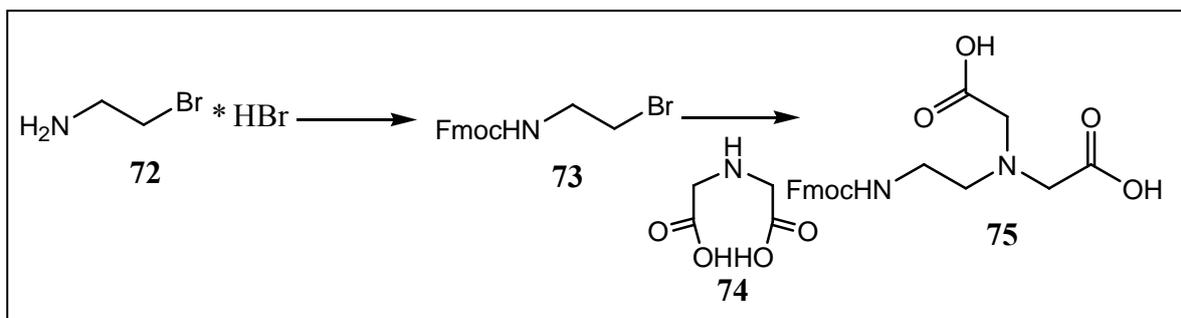
Um die beobachtete Aminolyse zu vermeiden, wurde statt des Chloressigsäuremethylesters Chloressigsäure verwendet.



Bei erfolgreicher Umsetzung wäre die Synthese zum Allylesters (**66**) verkürzt worden. In der Literatur ist die Darstellung der Carbonsäure (**69**) beschrieben.^[64] Das gewünschte Produkt wird *in situ* hergestellt und erst isoliert, sobald auch die zweite Amino-Gruppe mit Benzylchloroformiat geschützt vorliegt. Um die gewünschte Carbonsäure (**69**) zu isolieren, wurde eine Lösung aus N-Boc-ethylenediamin (**61**) mit Triethylamin in Toluol tropfenweise zu einer Lösung von Chloressigsäure in Toluol bei 25 °C hinzugegeben. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Reaktionslösung erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde bei pH 4 extrahiert. Im Massenspektrum konnte folgendes Cyclisierungsprodukt (**70**) nachgewiesen werden:

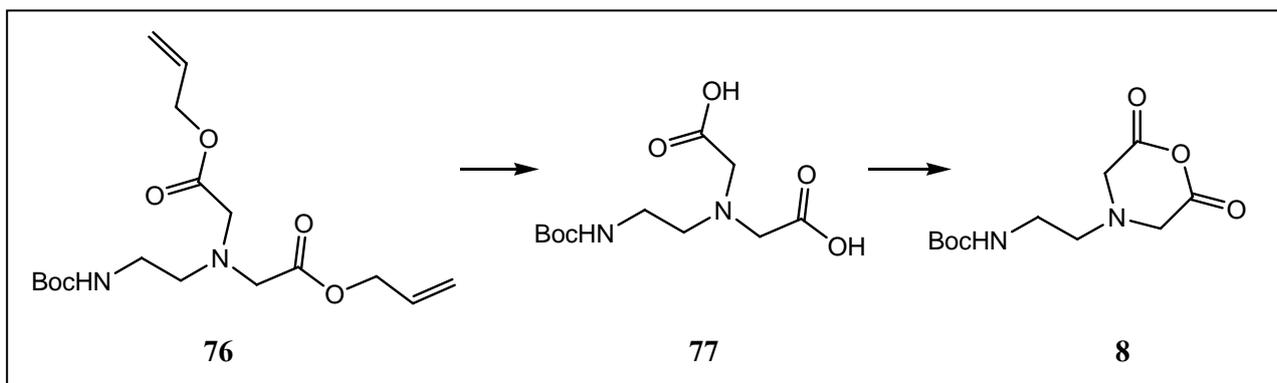


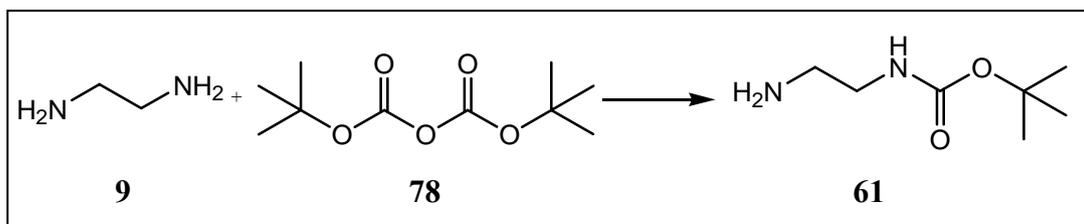
Ein weiterer Ansatz, um die Carbonsäure (**71**) rein herzustellen, bestand in der in der Literatur beschriebenen Synthese von N-(2-Aminoethyl)glycin.^[60] Dabei wurden im Überschuss Ethylenediamin (**9**) in der Kälte portionsweise mit Chloressigsäure versetzt. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit DMSO behandelt. Dabei fielen über vier Tagen kleine Kristalle des gewünschten Produkts aus. Ausbeute 43 %. Die anschließende Schützung der Aminogruppe mit Boc-Anhydrid in einem Wasser/Dioxan-Gemisch im Verhältnis 1:1 führte nach der Aufarbeitung mit Säure wieder zum gleichen Resultat.



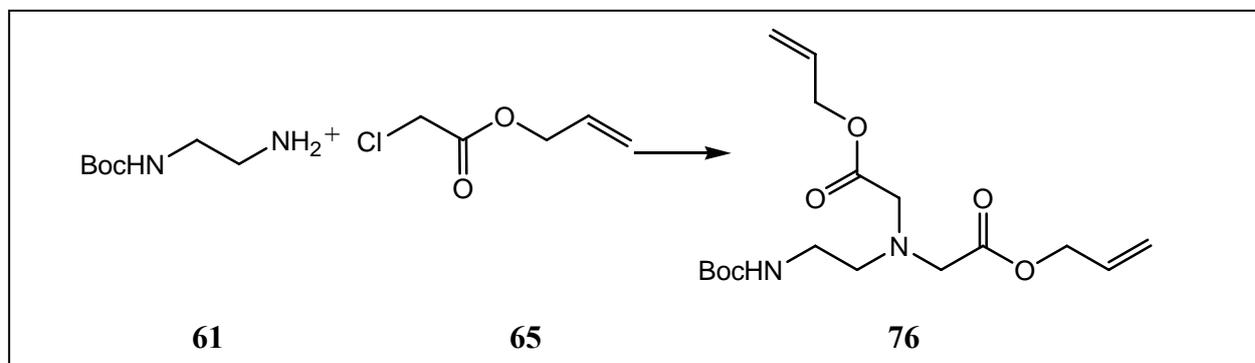
Um Monomerbausteine in die mittlere Position von Tripeptiden einzufügen, ist es nach der Versuchsvorschrift^[60] notwendig, dass die Amino-Gruppe mittels einer säurestabilen Gruppe geschützt wird. Bei den vorherigen Grundgerüsten müsste die Boc-Schutzgruppe daher in eine Fmoc-Schutzgruppe umgewandelt werden. Um diesen Syntheseschritt zu umgehen, wurde ein Ansatz gewählt, der von 2-Brom-ethylamin Hydrobromid (**72**) ausgeht. Das Ethylamin (**72**) wurde in einer Lösung von absolutem DCM mit Triethylamin aufgelöst und portionsweise mit Fmoc-Chlorid versetzt. Die anschließende säulenchromatographische Aufreinigung führte zu einer Ausbeute von 90 % des Bromids (**73**). Das Produkt (**75**) der Reaktion mit Iminodiessigsäure (**74**) und Triethylamin konnte nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung nicht isoliert werden.

Zur Synthese eines Grundgerüsts, womit Moleküle mit Aminogruppe verknüpft werden könnten, wurde ein Anhydrid (**8**) postuliert, was auch das Ziel des obigen Ansatzes mit der Dicarbonsäure (**75**) war. Nach retrosynthetischer Analyse müsste eine Dicarbonsäure mit einer Fmoc-Schutzgruppe (**75**) oder mit einer Boc-Schutzgruppe (**77**) an der Amino-Gruppe synthetisiert werden. Literaturbekannt ist der Allylester (**76**), der nach der Abspaltung der Allylschutzgruppe zur Dicarbonsäure (**77**) führt.^[65]





Für die erste Stufe der Darstellung des Allylesters (**76**) ist es wünschenswert eine hohe Ausbeute des Ausgangsproduktes, des N-Boc-ethylenediamins (**61**)^[66] zu erhalten. Quantitative Ausbeuten wurden erhalten, indem man einen Überschuss an Ethylenediamin (**9**) in CHCl_3 stark verdünnte und bei einer Temperatur von $0\text{ }^\circ\text{C}$ mit einer verdünnten Lösung von Di-*tert*-butyldicarbonat (**78**) in CHCl_3 tropfenweise versetzte. Nach einer Reaktionszeit von 16 Stunden erhielt man das N-Boc-ethylenediamin (**61**) nach mehreren Waschschritten und der Verdampfung des Lösungsmittels im Vakuum quantitativ rein als ein farbloses Öl.



Die Darstellung des Allylesters (**76**) ist in der Literatur beschrieben.^[65] In der Literaturangabe wurde das im vorherigen Schritt gewonnene Boc-alkylenediamin (**61**) in CH_3CN gelöst und mit einer Lösung von 2.2 Äquiv. Allylbromacetat (**65**) und 2.5 Äquiv. Diisopropylethylamin in CH_3CN versetzt. In der Literatur werden bei einer Reaktionszeit von 24 Stunden nach säulenchromatographischer Aufreinigung 86 % N-(2-[*tert*-Butoxycarbonylamino]-nitrilodiessigsäureallylester (**76**) isoliert. Da Allylbromacetat (**66**) nicht kommerziell erhältlich ist, wurde versucht, mit einer Erhöhung der Reaktionszeit und der eingesetzten Menge an Allylchloracetat (**65**) auf 3 Äquiv. ähnliche Ausbeuten zu erreichen.

Tabelle 3: Darstellung Boc-alkylenediamin (**76**) mit Allylchloracetat

Reaktionszeit in Stunden	Ausbeute in %
40	3
100	51
120	61
160	62

Die Ausbeute blieb zwischen den Reaktionszeiten von 120 bis 160 Stunden nahezu konstant. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, wurde in einem Experiment das in der Literatur angegebene Allylbromacetat hergestellt.^[67] Nach der Literaturvorlage wurden Allylalkohol (**79**) und Bromessigsäure (**80**) zu gleichen molaren Verhältnissen unter Zugabe von einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure verestert, indem das Reaktionsgemisch zum Rückfluss erhitzt wurde. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch gewaschen, die organische Phase getrocknet und das Produkt mit einer Ausbeute von 48 % durch eine Vakuumdestillation gewonnen. Experimente, in denen statt Allylchloracetat (**64**) Allylbromacetat (**65**) eingesetzt wurde, wurden daraufhin durchgeführt, wobei das Produkt nach einer Reaktionszeit von 20 Stunden mit einer Ausbeute von 85 % isoliert werden konnte.

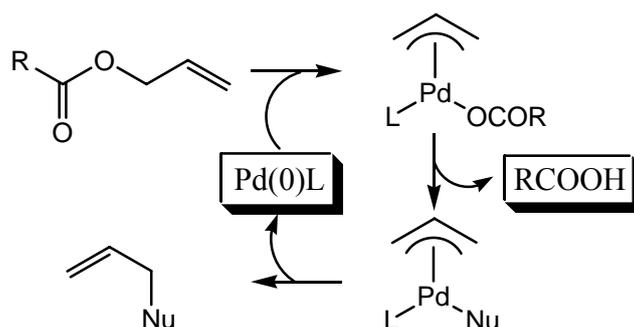
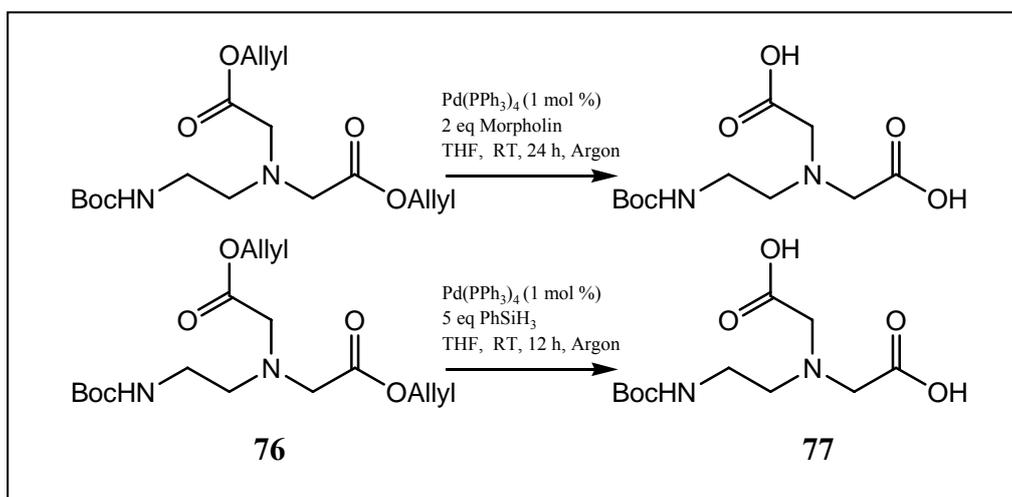
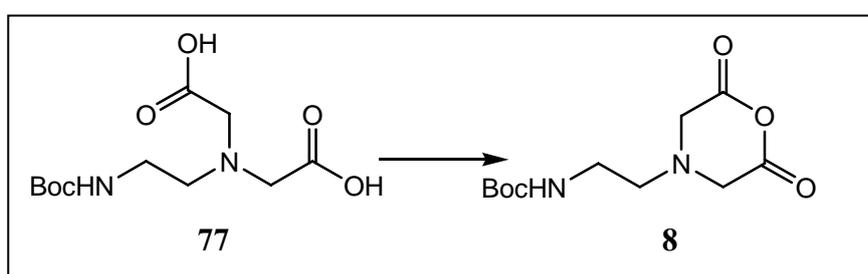


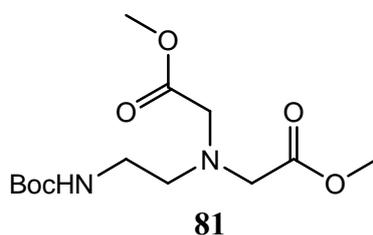
Abbildung 42: Reaktionsschema der Allyl-Schutzgruppenabspaltung

Die Abspaltung der Allyl-Schutzgruppe erfolgt in der Literatur^[68] standardmäßig durch eine Umsetzung bei RT mit Pd[PPh₃]₄ (10 mol %) und Morpholin (10 Äquiv.) in absolutem THF. Bei ersten Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Menge des Katalysators auf 1–2 mol % reduziert werden konnte. Die Aufreinigung erfolgte nach Entfernung des Morpholins durch Waschen mit Wasser, säulenchromatographisch. Die Dicarbonsäure (**77**) ging jedoch nach

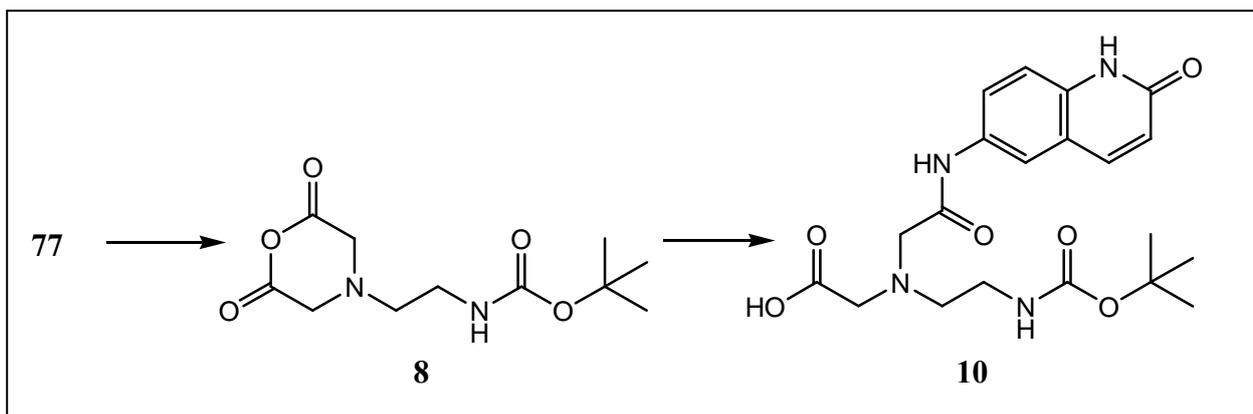
dem Waschschrift mit in die wässrige Phase über. Eine Extraktion des Morpholins mit verschiedenen Lösungsmittel bei unterschiedlichen pH-Werten und Abdestillieren des Morpholins durch Kugelrohrdestillation und säulenchromatographische Aufreinigungen führten nicht zur Isolierung der Dicarbonsäure. Daraus erwuchs der Entschluss, eine alternative Methode der Allyl-Schutzgruppen-Abspaltung ohne Morpholin zu wählen. In der Literatur^[65] wird ein Wechsel des Nucleophils (Nu) zum Phenylsilan aufgezeigt, wobei der Allylester in THF aufgelöst und mit 0.04 Äquiv. Pd[PPh₃]₄ und 4 Äquiv. Phenylsilan versetzt wird. Zur Aufarbeitung wurde die Dicarbonsäure (**77**) von den gebildeten Nebenprodukten säulenchromatographisch abgetrennt. Ausbeute 68 %.



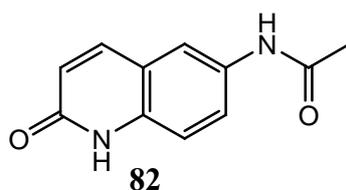
Bei Vorversuchen wurde die Dicarbonsäure (**77**) zum Anhydrid (**8**) umgesetzt, indem 1 Äquiv. der Dicarbonsäure (**77**) in DMF aufgelöst und bei 0 °C eine Lösung von 1.1 Äquiv. DCC in DMF zugetropft wurde. Die weitere Reaktion lief bei RT über 24 Stunden. Nach Filtration und Entfernung des Lösungsmittels wurde der Feststoff massenspektrometrisch untersucht. Zur Untersuchung im ESI wurde die Probe mit MeOH gelöst, so dass das Anhydrid als Dimethylester (**81**) nachgewiesen wurde. Der bei der Reaktion gebildete abfiltrierte Feststoff wurde NMR-spektroskopisch als das Harnstoffderivat des DCCs identifiziert.



Für die *in situ* Darstellung des Anhydrids (**8**) wurde die Methode nach Geigy *et al.*^[69] verwendet.

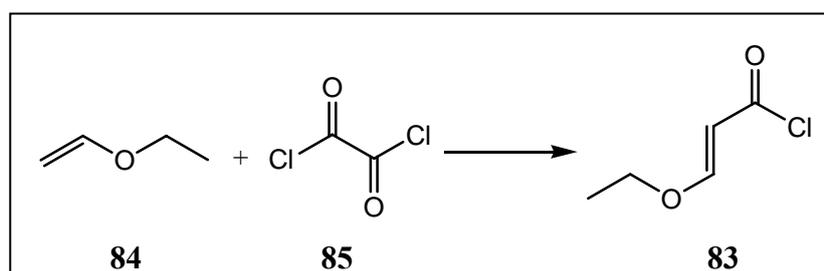


Dabei wird die Dicarbonsäure (**77**) in absolutem Pyridin unter Argon-Atmosphäre gelöst und mit 2 Äquiv. Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin für 24 Stunden auf 65 °C erwärmt. Nach Abkühlung wurde 1 Äquiv. des Chinolins (**3**) hinzugegeben und für weitere 24 Stunden bei RT gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels erfolgte die Isolierung der Carbonsäure (**10**) säulenchromatographisch. Ausbeute 33 %. Nebenprodukt der Reaktion war das Acetamid (**82**).



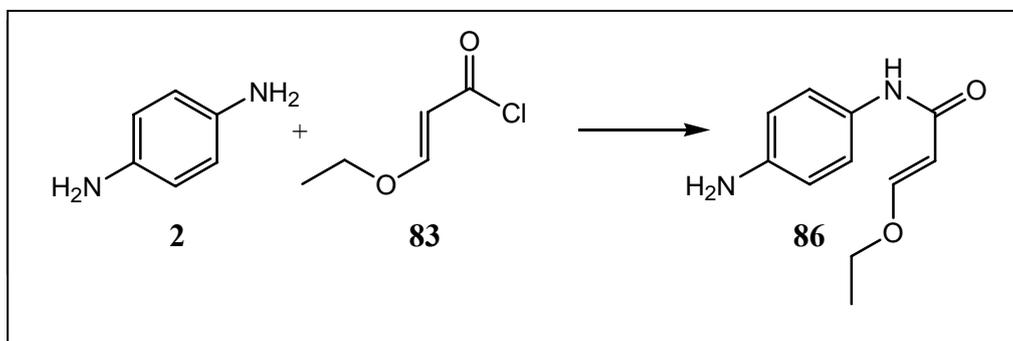
6.2 Synthese des 6-Aminochinolin-2(1H)-on

Zu Beginn der Synthese des 6-Aminochinolin-2(1H)-on (**3**) steht die Synthese des Säurechlorids (**83**).^[70]



Dabei wurden 1 Äquiv. Ethylvinylether (**84**) zu 1.5 Äquiv. Oxalylchlorid (**85**) bei 0 °C unter Argonatmosphäre zugetropft und nach weiteren zwei Stunden bei 0 °C die Reaktion nochmals zwölf Stunden bei RT gerührt. Das überschüssige Oxalylchlorid (**85**) wurde abdestilliert und die Reaktionslösung für eine halbe Stunde auf 120 °C erhitzt. Nach Vakuumdestillation konnte das Säurechlorid (**83**) als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 82 % gewonnen

werden. Es wurde angenommen, dass das Produkt aufgrund seiner Reaktivität schnellstmöglichst umgesetzt werden sollte. Nach Lagerung unter Argon wurde nach einer Woche eine Probe auf ihren Reinheitsgehalt überprüft, es konnten aber keine nennenswerten Zersetzungsprodukte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

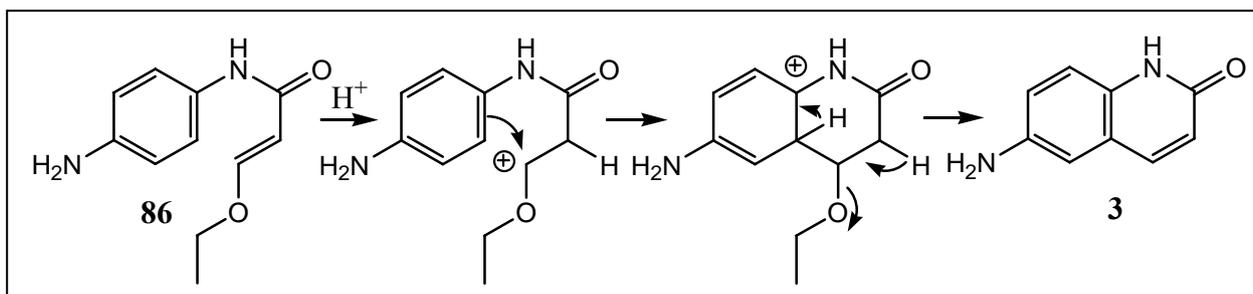


Die Darstellung des Acrylamids (**86**) erfolgte über die Amidierung von *para*-Phenylendiamin (**2**) und dem Säurechlorid (**83**) durch eine Base (Pyridin oder Triethylamin/DMAP). Das Säurechlorid (**83**) wurde dabei langsam zu einer Lösung des *para*-Phenylendiamins (**2**) und der Base zugegeben. Folgende Reaktionsbedingungen wurden getestet:

Tabelle 4: Testbedingungen zur Darstellung des Acrylamids (**86**)

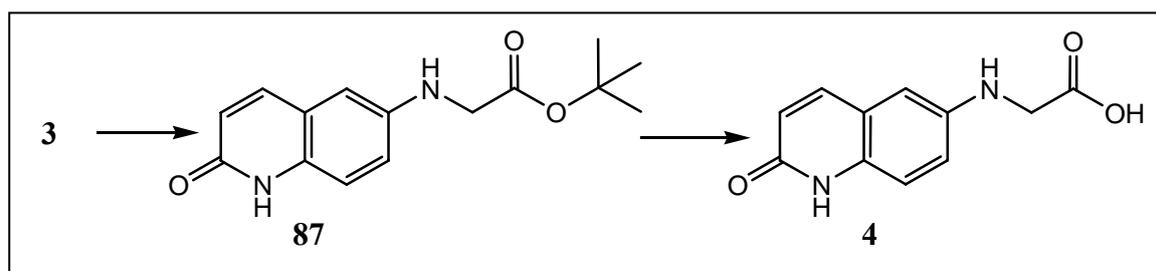
Säurechlorid (83)	para-Phenylendiamin (2)	Base	Katalysator	Zugabe bei	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Ausbeute
1 Equiv.	5 Equiv.	Et ₃ N	DMAP	0 °C	DCM	16 h	15 %
0.9 Equiv.	1 Equiv.	Pyridin	-	0 °C	THF	16 h	0 %
1 Equiv.	2 Equiv.	Et ₃ N	DMAP	0 °C	DCM	100 h	32 %
1 Equiv.	3 Equiv.	Et ₃ N	DMAP	0 °C	DCM	16 h	11 %
1 Equiv.	2.5 Equiv.	Et ₃ N	DMAP	0 °C	DCM	16 h	15 %
1 Equiv.	2.5 Equiv.	Et ₃ N	DMAP	25 °C	DCM	16 h	78 %

Die Aufarbeitung erfolgte über eine Filtration, Waschen mit Wasser und anschließende säulenchromatographischer Aufreinigung der Reaktionslösung. Die Umkristallisation der gewonnenen Mischphasen aus *para*-Phenylendiamin (**2**) und dem Acrylamid (**86**) führte nicht zum gewünschten Produkt. Da die Aufreinigung der Mischphasen über HPLC irreversible Verunreinigungen an der Säule herbeiführen würde, wurde davon abgesehen. Die Aufreinigung der Mischphasen gelang schließlich über die Anwendung einer zweiten säulenchromatographischen Aufreinigung.



Das Lactam (**3**) wurde durch säureinduzierte Cyclisierung dargestellt, wobei es sich dabei um eine exo-trig-Ringschlussreaktion handelt. In den ersten Versuchen kam als Säure konzentrierte Salzsäure zur Anwendung, die zu einer Lösung des Acrylamids (**86**) in Ethanol zugegeben wurde. Dabei konnte per Dünnschichtchromatographie und NMR-spektroskopisch eine Zersetzung des Acrylamids (**86**) zu *para*-Phenylendiamin (**2**) beobachtet werden. Durch die Zugabe des Acrylamids (**86**) zu konzentrierter Schwefelsäure^[7] und Rühren über Nacht bei RT konnte das Lactam (**3**) gewonnen werden. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionsmischung mit Wasser gequenchet, basisch eingestellt und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels mit MeOH extrahiert und anschließend säulenchromatographisch isoliert. Elementaranalysenrein wurde das Produkt durch Kristallisation des Pikrats mit einer Ausbeute von 34 % gewonnen. Durch eine Ionenaustauschsäule konnte das Pikrat in das jeweilige Hydrochlorid überführt werden.

6.3 Synthese des 6-Aminochinolin-2(1H)-on essigsäurederivats

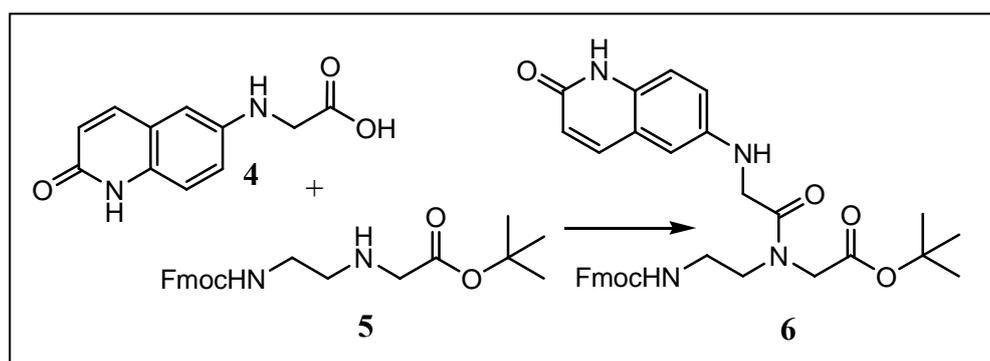


Zur Synthese der Carbonsäure (**4**) kam zuerst der direkte Schritt zur Anwendung, der auch in der Literatur für Thymin in dieser Form veröffentlicht ist.^[15] Dabei wurde das Lactam (**3**) in einer wässrigen KOH-Lösung aufgelöst und auf 40 °C erwärmt. Während der Erwärmungsphase erfolgte die Zugabe von 1.5 Äquiv. Bromessigsäure. Anschließend wurde bei 40 °C über zwei Tage gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und mit konzentrierter HCl auf pH 2 eingestellt. Dabei kam es zum Ausfall des Produkts bei 0 °C. Umkristallisationsversuche und säulenchromatographische Aufreinigungen führten nicht zur reinen Isolierung der Carbonsäure (**4**). Extraktionen mit DCM und EtOAc

bei Zugabe von NaCl zur wässrigen Phase wurden versucht; dabei fand man nur geringe Löslichkeiten in DCM und EtOAc.

Der Syntheseweg über den *tert*-Butylester (**87**) führte schließlich zur Isolierung der reinen Carbonsäure (**4**). Dazu wurde das Lactam (**3**) und 2 Äquiv. Hünig-Basis in MeOH gelöst und bei 50 °C mit 1.1 Äquiv. Bromessigsäure-*tert*-butylester versetzt und anschließend bei dieser Temperatur über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch und durch Umkristallisation wurde der *tert*-Butylester (**87**) in reiner Form mit einer Ausbeute von 31 % gewonnen. Der umkristallisierte *tert*-Butylester (**87**) wurde zur Darstellung der Carbonsäure (**4**) in DCM aufgelöst und mit konzentrierter HCl versetzt. Es kam zum Ausfall des Dihydrochlorids der Carbonsäure (**4**), das zur Isolierung abfiltriert und mit DCM gewaschen wurde. Ausbeute 97 %.

6.4 Synthese des PNA-Monomers

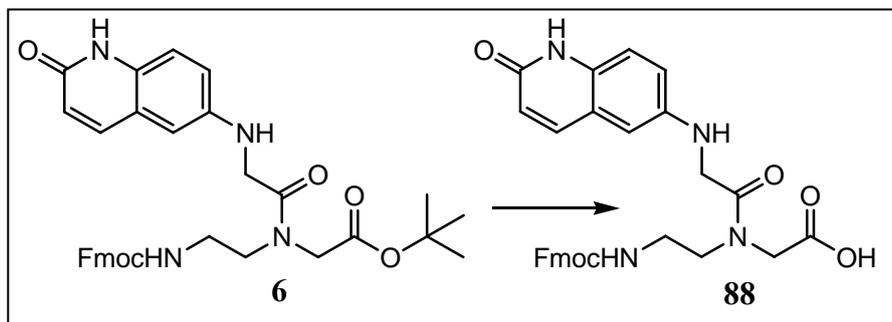


In der Synthese der PNA-Monomere findet man für jede Nucleobasen eigene Kupplungsbedingungen des PNA-Grundgerüsts (**5**) mit der Carbonsäure (**4**).^[71] In dieser Diplomarbeit ist eine Kupplungsmethode verwendet worden, die in der Arbeitsgruppe Göbel schon erfolgreich angewandt wurde.^[72] Dazu wurde das PNA-Grundgerüst (**5**) im geringen Überschuss von 1.1 Äquiv. mit der Carbonsäure (**4**) in DMF vorgelegt. Da beide eingesetzten Moleküle als Hydrochloride vorlagen, erfolgte die Neutralisation mit 3 Äquiv. Diisopropylethylamin. Als Kupplungsreagenzien wurden DIC und HOBt jeweils mit 3 Äquiv. zugegeben. Folgende Reaktionsbedingungen wurden dabei durchgeführt:

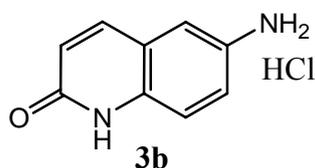
Tabelle 5: Kupplungsbedingungen

Reaktionszeit (h)	Reaktionstemperatur (°C)	Ausbeute (%)
100	25	8.7
3	65	8.6

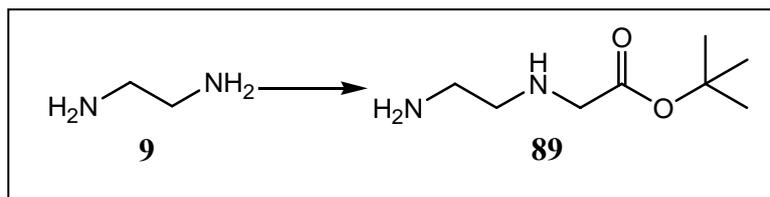
Zur Aufarbeitung erfolgte die Vorreinigung der eingengten Reaktionslösung säulenchromatographisch. Die Trennung der Mischfraktionen und Isolierung des reinen Produkts wurde über HPLC vorgenommen.



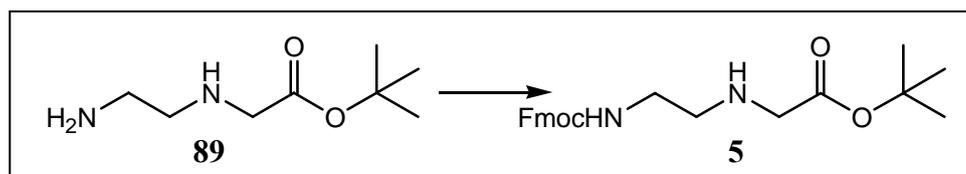
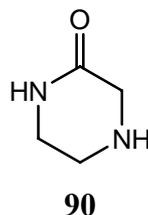
Zum Einbau in die mittlere Position von Tripeptiden ist es erforderlich, dass das Glycinat (**88**) als freie Carbonsäure vorliegt. In der Literatur gibt es für solche Strukturen zwei mögliche Wege: Das Molekül wird in DCM aufgelöst und mit 4N HCl in 1,4-Dioxan oder mit TFA versetzt. Das Produkt sollte aufgrund seiner erhöhten Polarität als Feststoff ausfallen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der erste Weg mit 4N HCl in 1,4-Dioxan gewählt. Es kam zur Bildung eines Niederschlages, der durch NMR-Spektroskopie und Massen-Spektrometrie als das Hydrochlorid des Lactams (**3b**) identifiziert wurde:



Durch säulenchromatographische Aufreinigung wurden noch zwei weitere Produkte isoliert. Durch NMR-Spektroskopie konnte die Fmoc-Schutzgruppe identifiziert werden. Denkbar wäre eine säureinduzierte intramolekulare Cyclisierung des Glycinats (**88**), wobei das Lactam (**3b**) als Abgangsgruppe fungiert.

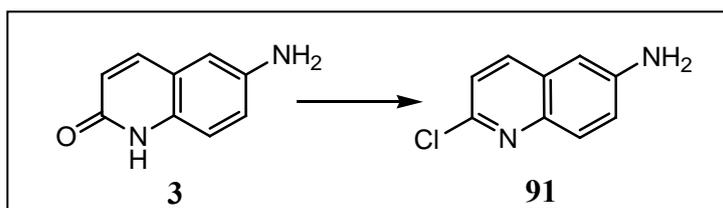
6.5 Synthese des PNA-Grundgerüsts^[73]

Die Darstellung des Glycinats (**89**) erfolgte aus *tert*-Butylbromacetat und Ethylendiamin (**9**). Das Ethylendiamin (**9**) wurde in zehnfachem Überschuss in DCM verdünnt und bei 0 °C mit einer Lösung von *tert*-Butylbromacetat in DCM tropfenweise versetzt. Nach dem Rühren der Reaktionslösung bei RT wurde sie gewaschen und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen, um das Glycinat (**89**) als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 64 % zu gewinnen. In der in der Literatur bekannten Synthese wurde das Glycinat (**89**) nur NMR-spektroskopisch nachgewiesen und ansonsten gleich weiterverarbeitet. Nach korrekter massenspektrometrischer Analyse wurde versucht, das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Wegen rascher Cyclisierung konnte keine korrekte Elementaranalyse erhalten werden. Dabei wurde das daraus entstehende Produkt NMR-Spektroskopisch nachgewiesen:

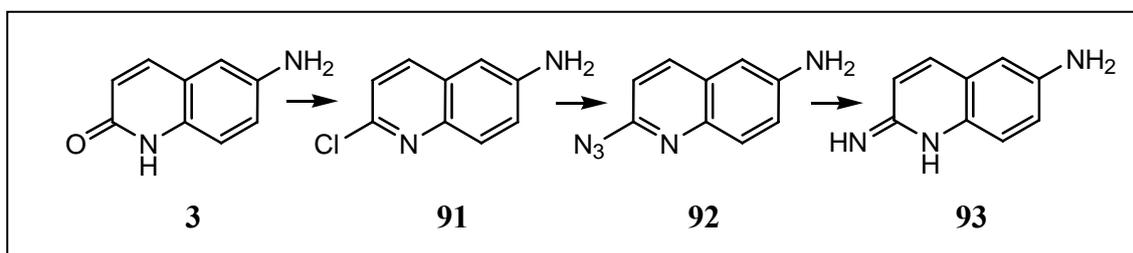


Zur Darstellung des PNA-Gerüsts (**5**) wurde Fmoc-Succinimid in DCM vorgelegt und eine Lösung des Glycinats (**89**) und Diisopropylethylamin in DCM langsam zugegeben. Nach dem Rühren über Nacht wurde die Lösung mit 1N HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase wurde die Lösung eingedampft, so dass bei -20 °C das PNA-Gerüst (**5**) als Hydrochlorid ausfiel, um mögliche Cyclisierungsreaktionen, wie im vorherigen Schritt, zu vermeiden. Durch Waschen mit DCM und Umkristallisation konnte das reine Produkt mit einer Ausbeute von 64 % gewonnen werden.

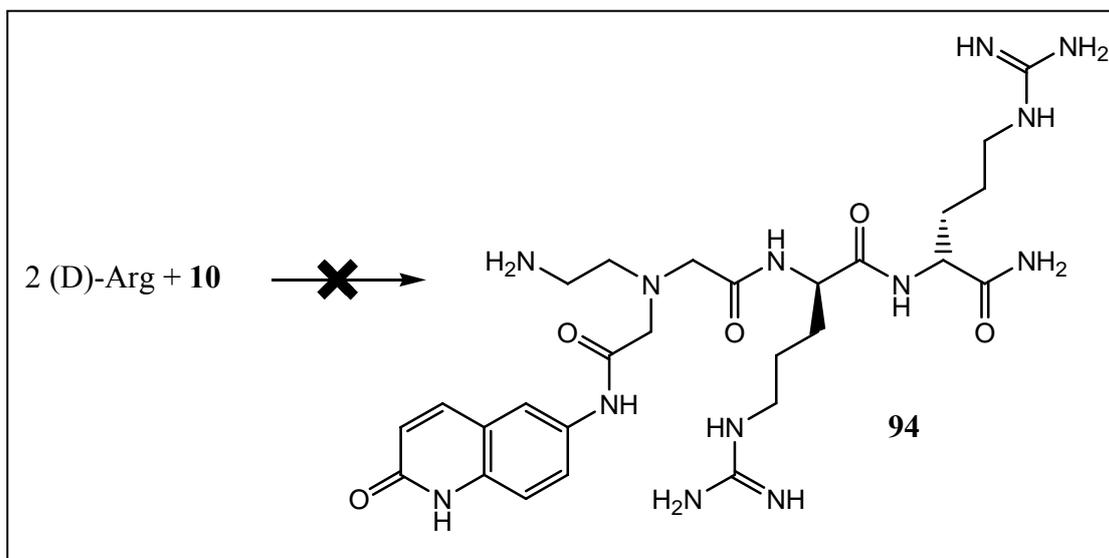
6.6 Synthese zum Iminoquinolin (93)



In weiterführenden Arbeiten sind die biologischen Eigenschaften des Iminoquinolinderivats (**93**), das aus dem Lactam (**3**) gewonnen werden soll, von Interesse. Daher wurden Versuche unternommen, die Möglichkeit der Chlorierung des Lactams (**3**) zu untersuchen.



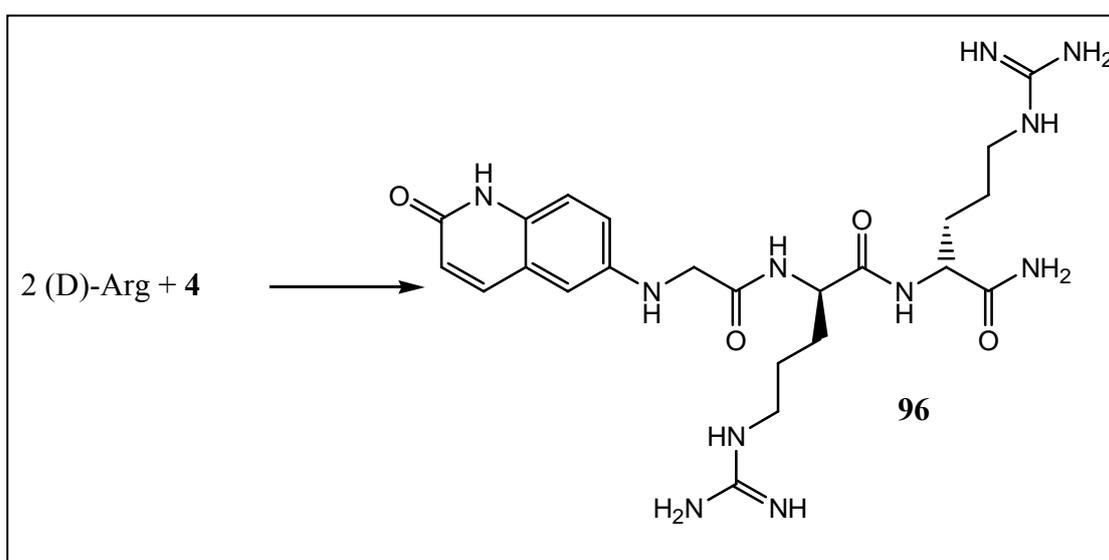
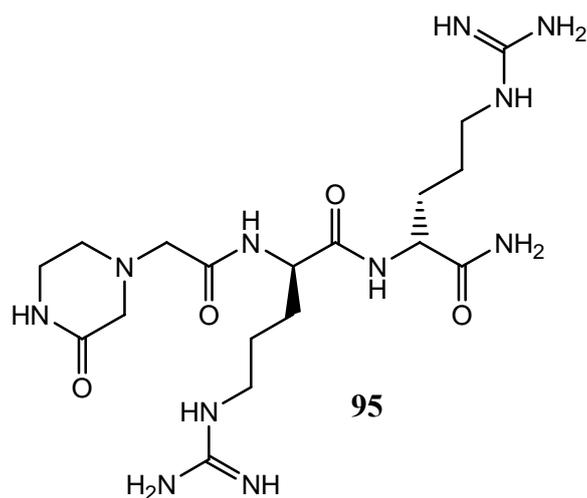
Ein möglicher Reaktionsweg führt über die chlororganische Verbindung (**91**) zum Azid (**92**) und schließlich zum Iminoquinolinderivat (**93**). Es sollte durch die Darstellung der chlororganischen Verbindung (**91**) gezeigt werden, dass weiterführende Schritte vom Lactam (**3**) zum möglichen Iminoquinolinderivat (**93**) möglich sind. Dazu wurde das Lactam (**3**) in POCl₃ refluxiert und analog zur Darstellung des Lactams (**3**) gequenchet, basisch eingestellt und nach dem Verdampfen des Lösungsmittels mit MeOH extrahiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde die chlororganische Verbindung (**91**) elementaranalysenrein als Pikrat mit einer Ausbeute von 15 % gefällt.

6.7 Synthese von Tripeptiden^[60]

Im Rahmen dieser Diplomarbeit war es das Ziel, das Lactam (**3**) auf das PNA-Grundgerüst zu kuppeln und dieses PNA-Monomer (**6**) zwecks biologischer Untersuchung in ein Tripeptid mit zwei Argininresten einzuführen. Die Struktur aus zwei Argininresten im Tripeptid wurde deshalb gewählt, da unter physiologischen Bedingungen Arginin protoniert vorliegt. Durch diese zwei kationischen Gruppen erhöht sich die Affinität zum Bulge der TAR-RNA. Der Grund für den Einbau des (D)-Arginins liegt darin, dass dieses in Zellkulturen langsamer abgebaut wird, da Zersetzungsenzyme die enantiomere Aminosäure schlechter erkennen. Da sich das PNA-Monomer (**6**) bei der Abspaltung der *tert*-Butylgruppe zersetzt hatte, wurde die Carbonsäure (**10**) zum Einbau in Tripeptide der Sequenz (**10**)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (**94**) benutzt. Nach Abtrennung des Tripeptides vom Harz und Aufreinigung wurde das Tripeptid (**95**) durch massenspektrometrische Untersuchung nachgewiesen.

M (C₁₈H₃₅N₁₁O₄) berechnet = 469.3; MS (ESI) m/z (%) = 470.2 (30) [M+H⁺], 235.6 (100) [M+2H⁺]

Das Tripeptid ist durch eine intramolekulare Cyclisierung und daraus folgende Abspaltung des Lactams (**3**) entstanden.

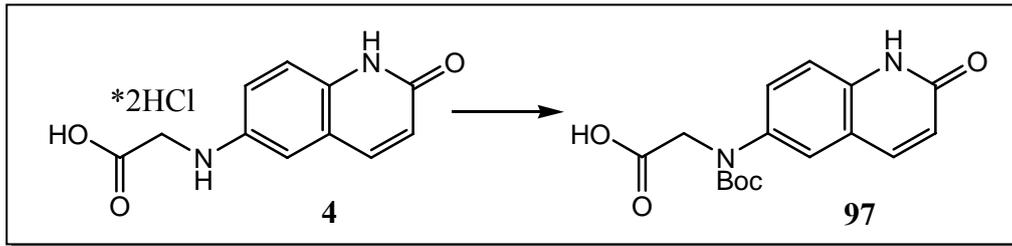


Das Essigsäurederivat des Lactams (**4**) wurde als Baustein für das Tripeptid (4)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (**96**) verwendet.

Der Aufbau des Tripeptids erfolgte an fester Phase, wofür als Harz das Rinkamid-MBHA-Harz (Abbildung 37) verwendet wurde. Bei der Abspaltung des Tripeptids von der festen Phase musste darauf geachtet werden, dass die Scavenger, wie Ethandithiol und Thioanisol, vorhanden sind. Die Guanidiniumschutzgruppen der Arginine, die ebenfalls abgespalten werden, werden durch die Scavenger abgefangen, damit eine S_E-Reaktion am Aromaten unterbunden wird.

Die Ausbeute und Reinheit des Tripeptides nach der Aufreinigung per HPLC erlaubten keine Messung der TAR-Affinität mittels FRET.

Um die möglichen Nebenreaktionen der Cyclisierung der Carbonsäure (**4**) mit einer weiteren Carbonsäure (**4**) zu vermeiden wurde das sekundäre Amin Boc-geschützt. Denkbar sind mit dieser Schützung des sekundärenamins höhere Kupplungsausbeuten bei der Darstellung des Tripeptids und höhere Ausbeuten bei der Darstellung des PNA Monomers (**6**).

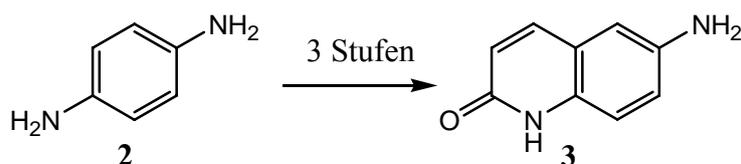


Dazu wurde die Carbonsäure (**4**) in MeOH aufgelöst und mit Triethylamin und Di-tert-butylidicarbonat versetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung und anschließender Umkristallisation lag die Carbonsäure (**97**) rein vor mit einer Ausbeute von 36 %.

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Synthese des PNA-Bausteine

Primäres Ziel der Diplomarbeit war die Synthese von 6-Aminochinolin-2(1*H*)-on (**3**) und dessen Kupplung über die Carbonsäure (**4**) mit dem PNA-Grundgerüst (**6**).



Das Chinolin (**3**) wurde durch eine dreistufige Synthese aus *para*-Phenylendiamin (**2**) erhalten und als Pikrat gefällt. Über eine Ionenaustauschsäule wurde das Hydrochlorid des Chinolins (**3b**) gewonnen. Durch Charakterisierung des RNA-Liganden mittels FRET konnte ein IC_{50} -Wert des Chinolin Hydrochlorids (**3b**) von $46 \mu\text{mol}$ ermittelt werden.

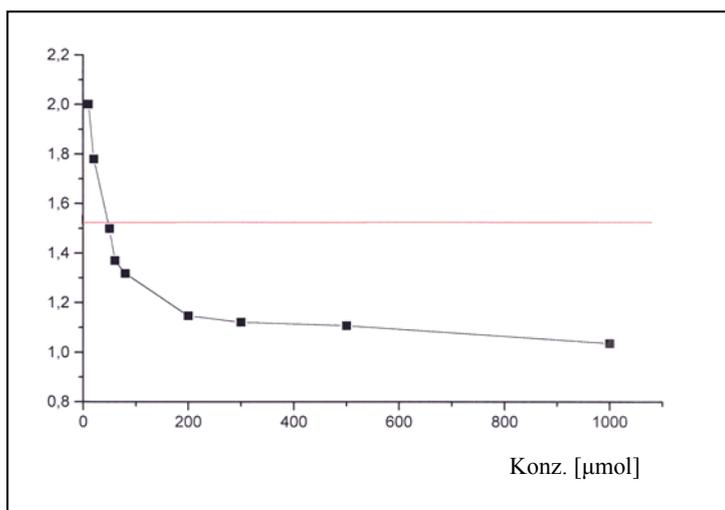
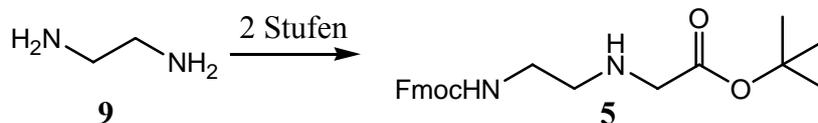


Abbildung 43: FRET-Emissionsdiagramm des Chinolin Hydrochlorid (**3b**)

Das kupplungsfähige Essigsäurederivat (**4**) wurde über den *tert*-Butylesters (**87**) des Chinolins (**3**) gewonnen.

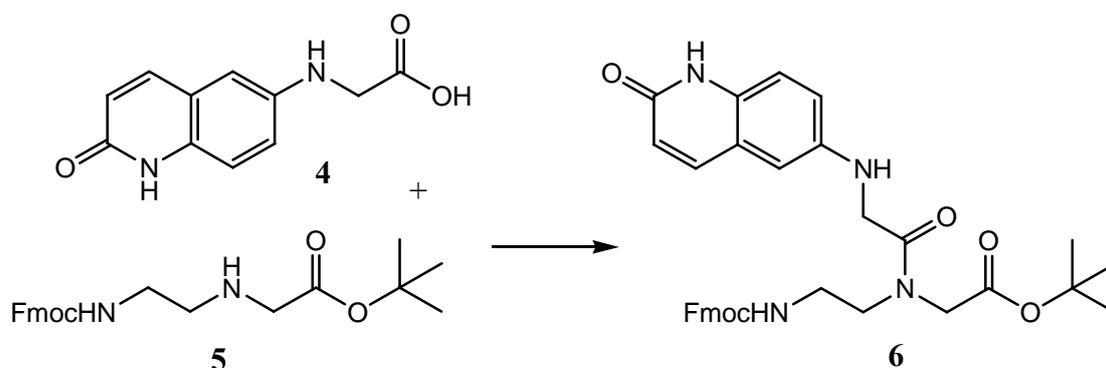


Die literaturbekannte zweistufige Synthese des PNA-Rückgrats (**5**) geht vom Ethylendiamin (**9**) aus.^[73]



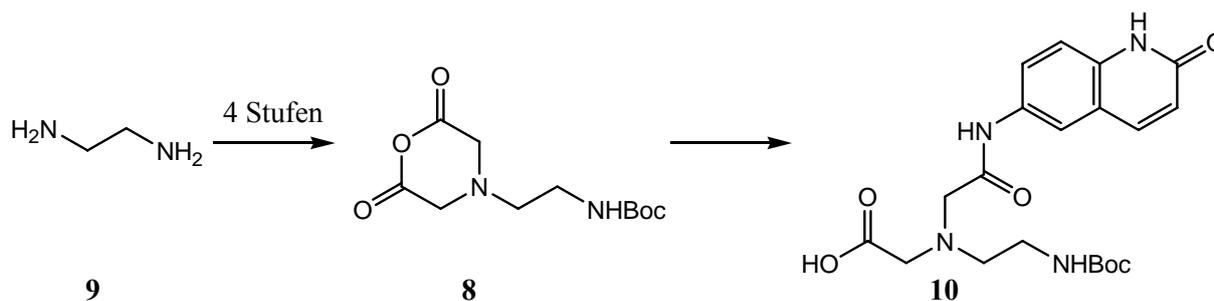
7.2 Synthese des PNA-Monomers

Das Ziel die Synthese des PNA-Monomers (**6**), konnte durch Kupplung des Essigsäurederivats (**4**) und des PNA-Rückgrats (**5**) mittels DIC/HOBt erreicht werden.

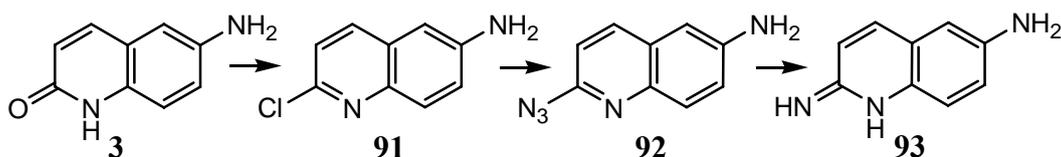


Das PNA-Monomer sollte in weiterführenden Arbeiten durch kombinatorische Chemie in ein Tripeptid eingebaut werden. Dazu wäre es jedoch notwendig, die *tert*-Butyl-Schutzgruppe durch Säurezugabe abzuspalten, um die Carbonsäure (**88**) zu erhalten, die als PNA-Monomer in ein Tripeptid eingebaut werden kann. Es wurde jedoch eine Zersetzung des PNA-Monomers in das Hydrochlorid des Chinolins (**3b**) und zwei Fragmenten des Fmoc-geschützten Grundgerüsts nachgewiesen.

7.3 Alternative Methoden



Auf einem anderen Weg konnte das Anhydrid (**8**) aus Ethylendiamin (**9**) in vier Syntheseschritten dargestellt werden, das mit dem Chinolin (**3**) gekuppelt werden konnte. Die resultierende Carbonsäure (**10**) wurde durch weiterführende Arbeiten in ein Tripeptid eingebaut. Nach der Abspaltung vom Harz und der Entschützung des Tripeptids fand eine intramolekulare Cyclisierung statt, wobei das Chinolin (**3**) als Abgangsgruppe nachgewiesen wurde.



In nachfolgenden Arbeiten sollten die Eigenschaften von Iminochinolin (**93**) als RNA-Ligand bestimmt werden. Der Syntheseweg sollte über eine dreistufige Synthese vom Chinolin (**3**) ausgehend zum Iminochinolin (**93**) führen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der erste Schritt, die Darstellung des Chloroquinolins (**91**), gelingt.

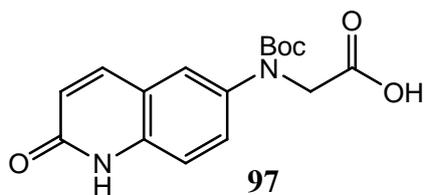
7.4 Ausblick

Das erwähnte Iminochinolin (**93**) sollte in nachfolgenden Arbeiten ebenfalls auf seine Eigenschaft als RNA-Ligand untersucht werden.

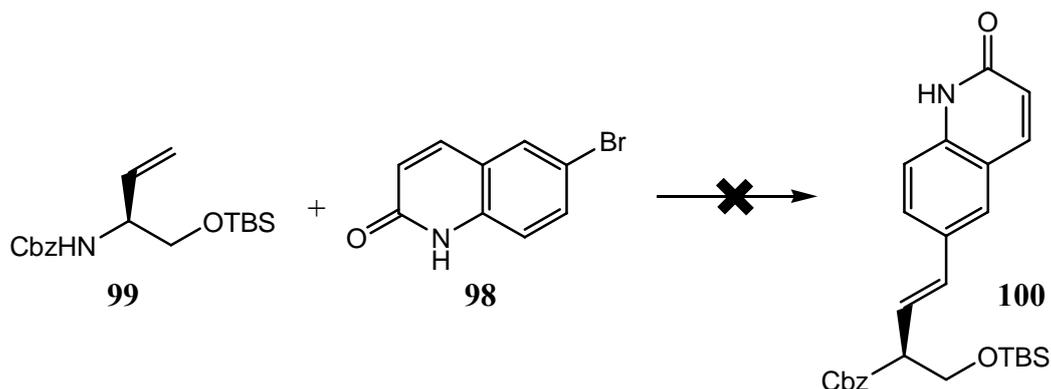
Die PNA-Monomere ließen sich nur mit geringen Ausbeuten kuppeln. In der Literatur zur Darstellung von PNA-Monomeren werden unterschiedliche Kupplungsreagenzien, wie EDC/HOBt, BOP/HOBt, TOTU oder PyBOP, für die PNA-Grundgerüste angegeben. Um bessere Ausbeuten zu erreichen, ist eine systematische Untersuchung der optimalen Kupplungsbedingungen vorzunehmen.

Um die Zersetzung des PNA-Monomers (**6**) bei der Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe zu verhindern, ist nach alternativen PNA-Rückgraden zu suchen. Methyl- oder Ethylester statt *tert*-Butylester wären durch Verseifung mit Natriumhydroxid in einem Wasser/Dioxan-Gemisch in das jeweilige Carboxylat zu überführen.

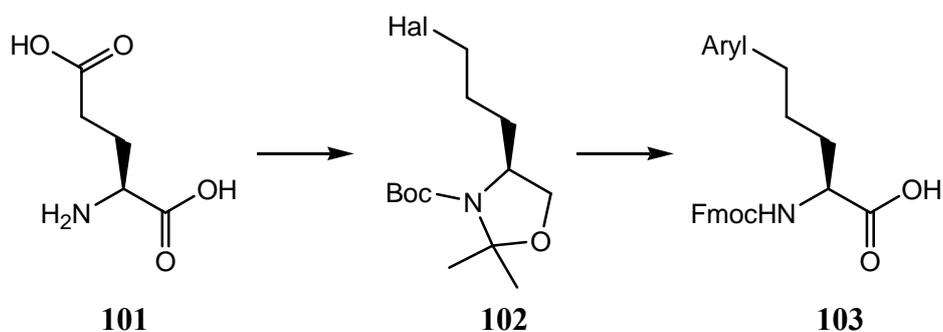
Aufgrund der niedrigen Ausbeute des Tripeptids (**4**)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (**96**) soll versucht werden die Kupplungsausbeute durch Vermeidung möglicher Nebenreaktionen zu erhöhen. Eine mögliche Nebenreaktion ist die Cyclisierung der zu kuppelnden Carbonsäure (**4**) mit einer weiteren Carbonsäure (**4**), die vermieden werden kann durch die Einführung einer Boc-Schutzgruppe am sekundären Amin. Eine Kupplung mit der Boc-geschützten Carbonsäure (**97**) verspricht bessere Kupplungsausbeuten.



In vorangegangenen Arbeiten^{[74][75]} konnten das Lactam (**98**) mittels Heck- oder Suzuki-Reaktion nicht an das Vinylglycinderivat (**99**) gekuppelt werden.



Als alternative Kupplungsmethode wird gerade in einer Doktorarbeit die „chiral pool“-Synthese mit Glutaminsäure (**101**) untersucht, die in die halogenierte Spezies (**102**) überführt werden soll. Die Kreuzkupplungsreaktion erfolgt durch eine $\text{Fe}(\text{acac})_3$ vermittelte Grignard-Reaktion.^[76]



8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

NMR-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde das Gerät *AM 250* (250-MHZ) der Firma *Bruker* verwendet. Die chemische Verschiebung (δ) wurde in ppm angegeben und auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen: DMSO- d_6 $\delta = 2.49$; $CDCl_3-d_1$ $\delta = 7.23$; D_2O-d_2 $\delta = 4.79$. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Die Feinstruktur der 1H -Signale wurde mit s für Singulett, bs für breites Singulett, d für Duplett, dd für Doppelduplett, t für Triplet und m für Multiplet angegeben. Die für die Zuordnung relevanten Protonen sind kursiv abgebildet. Alle Messungen erfolgten bei 300K.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Für die Aufnahme der FT-IR-Spektren wurde das Gerät *420 Series* der Firma *Jasco* verwendet. Die Signale wurden auf ganze Zahlen gerundet und in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ angegeben. Die Bandenintensitäten wurden mit s für strong, m für medium und w für weak gekennzeichnet. Die Messungen wurden an KBr-Preßlingen bzw. NaCl-Fenstern der jeweiligen Substanzen durchgeführt.

Elementaranalyse:

Elementaranalysen wurden mit dem Gerät *Heraeus CHN Rapid* erstellt.

Massenspektroskopie:

ESI-MS: Elektrospray-Gerät der Firma *Fisons* (VG Plattform II)

MALDI-MS: Matrix-Ionisations-Gerät der Firma *Fisons* (VG Tofspec)

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit einem Heiztischmikroskop nach Kofler. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie kam Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator zur Anwendung (*Merck* Nr. 5554; 0.2 mm Schichtdicke). Die

Laufstrecke betrug 3.5-4.5 cm. Alle R_f -Werte wurden mit einer UV-Lampe der Firma *Konrad Benda* (Typ *NU-6KL*) bei Wellenlängen von 254 nm bzw. 366 nm sichtbar gemacht. Als Färbereagenz wurde Kaliumpermanganat als Lösung und eine Ninhydrin-Lösung, die aus 3.75 g Ninhydrin, gelöst in einem Gemisch aus 25 mL *n*-Butanol und 25 mL Aceton verwendet.

Präparative Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet.

Semipräparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie:

Es wurden folgende Geräte verwendet: Programmierbare *Waters Pumpe 590*, Differenzialrefraktometer *R401*, Einkanalpotenziometerschreiber *BBC Metrawatt Servogor 120*, Fraktionssammler *Isco Foxy*, *Waters UV-Detektor Modell 440*, Refraktometer-Detektor *Waters 410*, Servogor Zweikanalschreiber und *Knauer Eurochrom 2000* Integration Package.

Wasserfreie Lösungsmittel:

THF wurde durch Aluminiumoxid (*ICN Alumina N-Super I*) vorgetrocknet und von Natrium/Benzophenon abdestilliert.

Das DCM wurde unter Molsieb von der Firma *Fluka* gekauft.

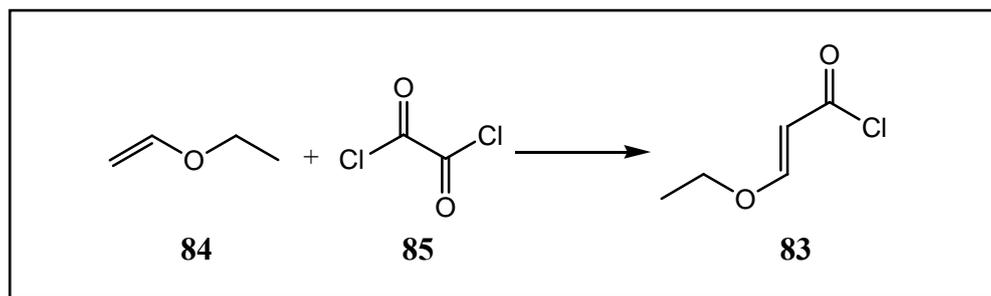
In vitro Messung:

Die Messungen wurden in 96-well Platten der Firma *Corning* mit no binding-surface durchgeführt. Für die Messungen kam das Gerät Fluostar der Firma *BMG-Labtechnologie* zur Anwendung. Alle Messungen erfolgten bei 37 °C.

Liste der synthetisierten Verbindungen

- (E)-3-Ethoxy-2-propenoylchlorid (**83**)
- N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (**86**)
- 6-Aminochinolin-2(1*H*)-on (**3**)
6-Aminochinolin-2(1*H*)-on Pikrat (**3a**)
6-Aminochinolin-2(1*H*)-on hydrochlorid (**3b**)
- 6-(*tert*-Butoxycarbonylmethyl)-6-aminochinolin-2-(1*H*)-on (**87**)
- 6-(Carboxymethyl)-6-Aminochinolin-2-(1*H*)-on Dihydrochlorid (**4**)
- 6-[Carboxymethyl-(*tert*-Butylcarbonyl)-amino]-chinolin-2-(1*H*)-on (**97**)
- N-(2-Aminoethyl)glycin (**71**)
- 2-(Brom-ethyl)-carbaminsäure-9*H*-fluoren-9-yl-methylester (**73**)
- N-(2-Aminoethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester (**61**)
- N-(2-[*tert*-Butoxycarbonylamino]nitrilodiessigsäure-allylester (**76**)
- N-(2-[*tert*-Butoxycarbonylamino]nitrilodiessigsäure (**77**)
- *tert*-Butyl N-(2-aminoethyl)-glycinat (**89**)
- *tert*-Butyl N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-glycinat
Hydrochlorid (**5**)
- [2-(2-Chloro-acetylamino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butylester (**68**)
- Allylbromacetat (**65**)
- {[2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-[2-(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylamino)-acetyl]-amino}-essigsäure *tert*-butylester (**6**)
- 6-Amino-2-chloro-chinolin (**91**)
6-Amino-2-chloro-chinolin Pikrat (**91a**)
- N-{(2-[*tert*-Butoxycarbonylamino]ethyl)-[(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylcarbamoyl)-methyl]-nitrilo}-essigsäure (**10**)
- (4)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (**96**)

8.2 Darstellung von (E)-3-Ethoxy-2-propenoylchlorid (**83**)^[70]



72 mL Oxalylchlorid (**85**) (0.83 mol, 1.5 Äquiv.) wurden in einem 250 mL Dreihalskolben unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Bei 0°C wurden 53.5 mL Ethylvinylether (**84**) (0.55 mol, 1 Äquiv.) langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden bei 0°C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung langsam auf RT gebracht und bei dieser Temperatur für weitere zwölf Stunden gerührt. Das überschüssige Oxalylchlorid wurde mittels einer Vigreux-Kolonnen bei einer Temperatur von 63-64°C abdestilliert. Der Rückstand wurde für 30 Minuten auf 120°C erhitzt, wobei entstandenes Kohlenmonoxid über einen Blasenprüfer aus der Reaktionsapparatur entfernt wurde. Die Isolierung erfolgte über eine Vakuumdestillation. Ergebnis war eine farblose Flüssigkeit.

Ausbeute: 61.25 g (81.6 %)

Sdp: 70-73 °C/11 mbar (Literatur^[70]: Sdp: 60-61 °C/5 mbar).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (d, J = 12.0, 1H, =CH-O-), 5.53 (d, J = 12.0, 1H, ClOC-CH=), 4.08 (q, J = 7.0, 2H, O-CH₂-), 1.42 (t, J = 7.0, 3H, -CH₃)

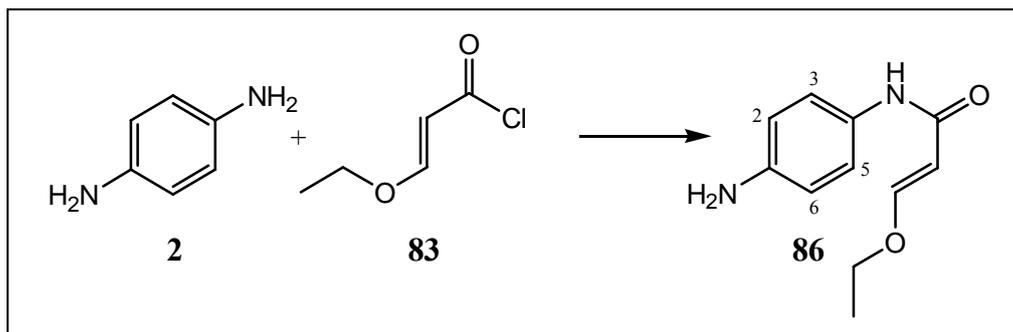
IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 2993 (m), 2953 (s), 2895 (s), 1684 (w), 1618 (w), 1603 (w), 1474 (m), 1427 (w), 1306 (w), 1220 (w), 1184 (w), 1112 (s), 1013 (m), 963 (w), 932 (w), 844 (w), 822 (m), 730 (m)

Elementaranalyse (%) für C₅H₇ClO₂ (134.56)

berechnet: C 44.63 H 5.24

gefunden: C 44.63 H 5.32

8.3 Darstellung von N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid (**86**)



27 g *para*-Phenyldiamin (**2**) (0.25 mol, 2.5 Äquiv.) wurden in 200 mL abs. DCM gelöst und mit 28 mL Triethylamin (0.2 mol, 2 Äquiv.) und einer Spatelspitze DMAP versetzt. Unter starkem magnetischem Rühren wurde bei RT langsam eine Lösung von 13.51 g (E)-3-Ethoxy-2-propenoyl-chlorid (**83**) (0.1 mol, 1 Äquiv.) in 50mL abs. DCM zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mehrmals mit Wasser gewaschen (2 x 100 mL). Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Aufreinigung des gelben Feststoffs erfolgte säulenchromatographisch in zwei Schritten. Bei der Vorreinigung (Hex/EtOAc 10:1) konnte nur eine Mischphase mit dem überschüssigen Edukt gewonnen werden. Durch eine zweite Aufreinigung (Hex/2-Propanol 1:1) konnte das Produkt rein isoliert werden. Durch eine zweite säulenchromatographische Aufreinigung (Hex/2-Propanol 1:1) der Mischphasen gelang es, diese ebenfalls zu trennen.

Ausbeute: 16.18 g (78%)

R_f = 0.35 (EtOAc/Hex 10:1)

Smp.: 110 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 9.30 (s, 1H, -NH-CO-), 7.39 (d, J = 12.2, 1H, =CH-O), 7.24 (d, J = 8.7, 2H, H^{2,6}-Phenyl), 6.49 (d, J = 8.7, 2H, H^{3,5}-Phenyl), 5.47 (d, J = 12.5, 1H, CO-CH=), 4.82 (s, 2H, -NH₂), 3.91 (q, J = 7.0, 2H, -O-CH₂-), 1.27 (t, J = 7.0, 3H, -CH₃)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3403 (w), 3271 (m), 2981 (w), 2359 (w), 1871 (w), 1658 (s), 1608 (s), 1515 (s), 1242 (m), 1153 (s), 1012 (w), 960 (w), 815 (m), 767 (w), 700 (w), 535 (w), 517 (w)

Elementaranalyse (%) für $C_{11}H_{14}N_2O_2$ (206.11):

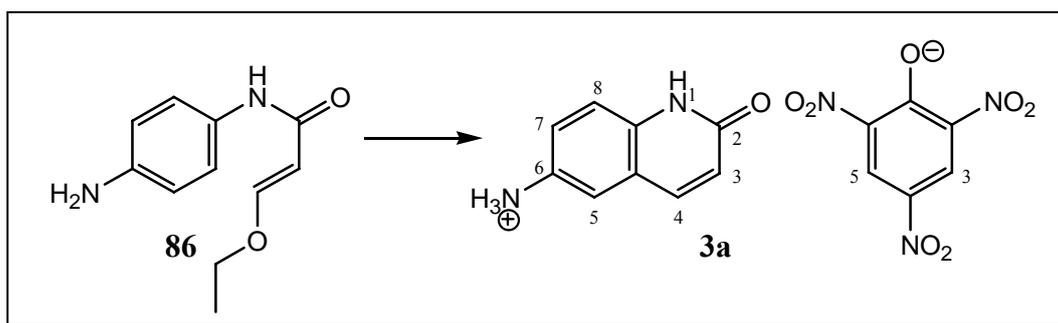
berechnet: C 64.06 H 6.84 N 13.58

gefunden: C 64.06 H 6.88 N 13.32

8.4 Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1H)-on (**3**)

Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1H)-on Pikrat (**3a**)

Darstellung von 6-Aminochinolin-2(1H)-on hydrochlorid (**3b**)



5.31 g N-(4-Aminophenyl)-(E)-3-ethoxyacrylamid **86** (0.025 mol, 1 Äquiv.) wurden portionsweise zu 15 mL konzentrierter Schwefelsäure gegeben und für zwölf Stunden bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz auf 300 mL Eis gegeben und anschließend mit 6 N-Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Die wässrige Lösung engte man zur Trockne ein und extrahierte den Rückstand mit siedendem Methanol. Das Extrakt wurde über $MgSO_4$ getrocknet und eingeeengt. Der verbleibende Feststoff wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (MeOH/EtOAc 1:9 + 1% NH_3). Zur weiteren Aufreinigung wurde das Rohprodukt in MeOH aufgelöst und unlösliche Bestandteile durch Filtration entfernt. Analysenrein wurde (**3**) durch Kristallisation des Pikrats (**3a**) gewonnen. Das Hydrochlorid (**3b**) konnte über eine Ionenaustauschsäule aus dem Pikrat (**3a**) gewonnen werden.

Ausbeute: 1.40 g (33.8%)

$R_f = 0.2$ (MeOH/EtOAc 1:9 + NH_3)

Smp.: 245°C

1H -NMR (250 MHz, DMSO): $\delta = 11.91$ (s, 1H, -NH-), 10.4 – 9.1 (bs, 3H, $-NH_3^+$), 8.60 (s, 2H, $H^{3,5}$ -Pikrat), 7.98 (d, $J = 9.5$, 1H, H^4 -Chinolin), 7.57 (d, $J = 2.2$, 1H, H^5 -Chinolin), 7.46 – 7.35 (m, 2H, $H^{7,8}$ -Chinolin), 6.58 (d, $J = 9.5$, 1H, H^3 -Chinolin),

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3319 (m), 3081 (s), 2923 (w), 2661 (s), 2614 (s), 2366 (s), 1660 (w), 1629 (w), 1610 (w), 1567 (w), 1499 (w), 1418 (w), 1364 (w), 1333 (m), 1267 (m), 1169 (m), 1158 (m), 1124 (m), 1078 (m), 962 (s), 941 (s), 924 (s), 904 (m), 893 (s), 870 (s), 837 (m), 828 (w), 787 (s), 767 (s), 741 (s), 711 (m), 680 (s), 597 (s), 564 (s)

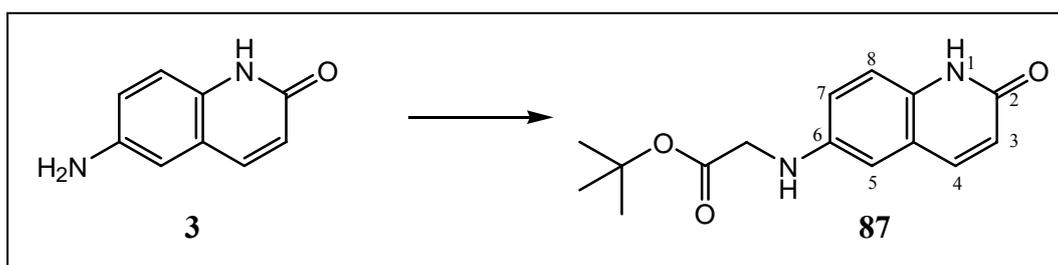
$[M+H^+]$ ($C_9H_9N_2O$)⁺ berechnet = 161.17; MS (ESI) m/z (%) = 160.7 (100) $[M+H^+]$, 161.8 (10.41)

Elementaranalyse (%) für $C_{15}H_{11}N_5O_7$ (373.28):

berechnet: C 46.28 H 2.85 N 17.99

gefunden: C 46.20 H 2.81 N 17.75

8.5 Darstellung von 6-(*tert*-Butoxycarbonylmethylamino)chinolin-2-(1*H*)-on (**87**)



0.66 g 6-Aminochinolin-2(1*H*)-on **3** (4.12 mmol, 1 Äquiv.) wurden zu einer Lösung von 1.41 mL Diisopropylethylenamin (8.24 mmol 2 Äquiv.) in 40 mL Methanol gegeben. In einem Ölbad wurde die Lösung auf 50 °C erwärmt, wobei man während der Erwärmungsphase 1.8 mL Bromessigsäure-*tert*-butylester (12.1 mmol, 3 Äquiv.) zugetropfte. Bei Rückflusskühlung wurde die Reaktion über 60 Stunden gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Gradient: EtOAc/Hexan 5:1→EtOAc/Hex 10:1→EtOAc) zu einem gelben Feststoff aufgereinigt [Ausbeute: 840 mg (74 %)]. Dieser wurde aus EtOAc/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 350 mg (31 %)

R_f = 0.48 (EtOAc/MeOH 9:1)

Smp.: 167–170 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ = 11.42 (s, 1H, CO-NH-), 7.70 (d, J = 9.5, 1H, H^4 -Chinolin), 7.10 (d, J = 8.7, 1H, H^8 -Chinolin), 6.93 (dd, J = 2.5/8.7, 1H, H^7 -Chinolin), 6.63 (d, J = 2.5, 1H, H^5 -Chinolin), 6.40 (d, J = 9.5, 1H, H^3 -Chinolin), 5.88 (t, J = 6.5, 1H, Chinolin-NH-) 3.79 (d, J = 6.5, 2H, - CH_2 -), 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl)

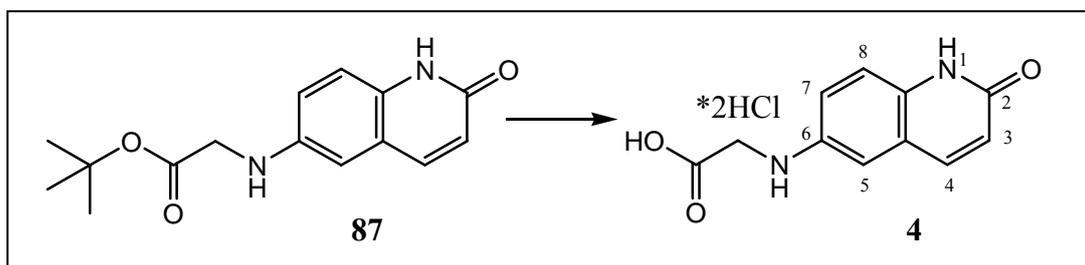
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3380 (m), 3138 (m), 2979 (s), 2937 (s), 2811 (s), 2778 (s), 1934 (w), 1888 (w), 1804 (w), 1726 (s), 1665 (s), 1624 (s), 1517 (m), 1436 (s), 1367 (s), 1352 (s), 1254 (s), 1235 (s), 1155 (s), 1132 (s), 1046 (m), 1028 (m), 1004 (m), 972 (m), 946 (m), 929 (m), 901 (m), 846 (m), 818 (m), 773 (m), 762 (m), 756 (m), 687 (m), 608 (m)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ (274.31):

berechnet: C 65.68 H 6.61 N 10.21

gefunden: C 65.43 H 6.73 N 10.11

8.6 Darstellung von 6-(Carboxymethylamino)chinolin-2-(1H)-on Dihydrochlorid (**4**)



660 mg des Esters (**87**) (2.4 mmol, 1 Äquiv.) wurde in 40 mL absolutem DCM aufgelöst. Die Lösung wurde bei RT gerührt, wobei einige Tropfen konzentrierter Salzsäure zugegeben wurden. Die gelbe, trübe Lösung wurde über Nacht weitergerührt. Der entstandene gelbe Niederschlag des Salzes (**4**) wurde abfiltriert, mit DCM gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 680 mg (97.1 %)

R_f = 0.14 (EtOAc/MeOH 9:1)

Smp.: 138 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): δ = 12.3 (bs, 1H, COOH) 7.93 (d, J = 9.5, 1H, H^4 -Chinolin), 7.34 – 7.25 (m, 2H, $H^{7,8}$ -Chinolin), 7.11 (d, J = 1.5, 1H, H^5 -Chinolin), 6.63 (d, J = 9.5, 1H, H^3 -Chinolin), 6.3 (bs, 4H, Chinolin- NH_2^+ -, CO- NH_2^+ -), 4.00 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$)

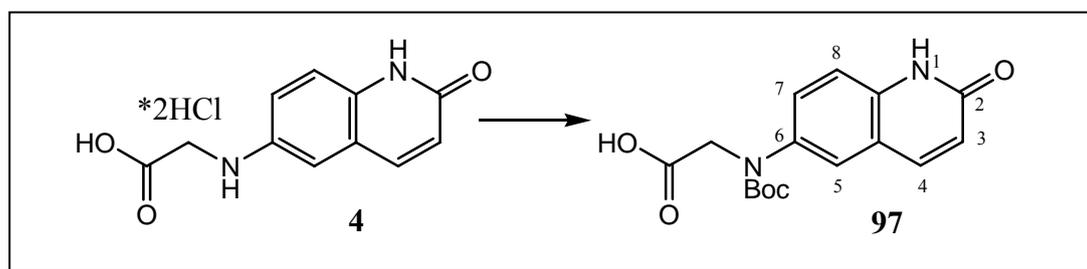
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3420 (w), 3084 (s), 3048 (s), 2974 (s), 2944 (s), 2867 (s), 2826 (s), 2784 (s), 2944 (s), 2867 (s), 2826 (s), 2784 (s), 2750 (s), 2716 (s), 2658 (s), 2570 (s), 2501 (s), 2405 (s), 1758 (s), 1697 (m), 1648 (s), 1621 (s), 1543 (s), 1523 (s), 1453 (m), 1430 (m), 1414 (s), 1386 (s), 1352 (s), 1291 (m), 1276 (s), 1263 (s), 1202 (s), 1171 (m), 1160 (m), 1133 (m), 1054 (m), 1035 (m), 1004 (m), 980 (m), 964 (m), 955 (m), 920 (m), 901 (m), 887 (m), 845 (s), 761 (m), 716 (m), 681 (m), 648 (m), 604 (m), 580 (m), 560 (w)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}_2$ (291.13):

berechnet: C 45.38 H 4.15 N 9.62

gefunden: C 45.37 H 4.08 N 9.42

8.7 Darstellung von 6-[Carboxymethyl-(*tert*-Butylcarbonyl)-amino]-chinolin-2-(1H)-on (97)



263 mg der Carbonsäure (4) (0.9 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 20 mL MeOH aufgelöst. Die Lösung wurde bei RT gerührt, dabei wurden 250 μL Triethylamin (1.8 mmol, 2 Äquiv.) und 218 mg Di-*tert*-butyldicarbonat (1 mmol, 1.2 Äquiv.) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht weitergerührt. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Gradient: MeOH/EtOAc 1:9 \rightarrow MeOH/EtOAc 1:3) zu einem gelben Feststoff aufgereinigt. Dieser wurde aus MeOH/Hex umkristallisiert.

Ausbeute: 102 mg (36 %)

R_f = 0.24 (MeOH)

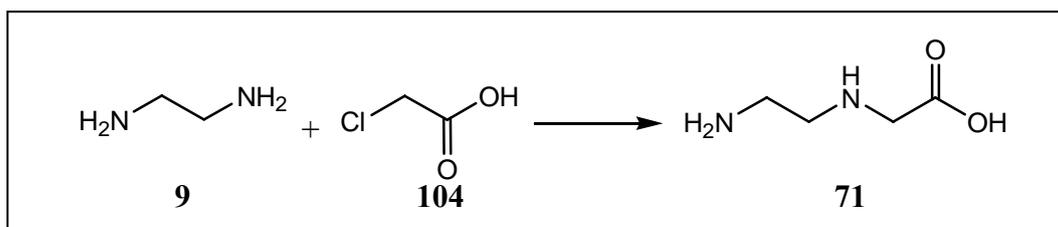
Smp.: 187-190 $^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 11.74$ (s, 1H, NH) 7.82 (d, $J = 9.5$, 1H, H^4 -Chinolin), 7.59 (d, $J = 1.7$, 1H, H^5 -Chinolin), 7.47 (d, $J = 8.5$, 1H, H^8 -Chinolin), 7.21 (d, $J = 8.5$, 1H, H^7 -Chinolin), 6.36 (d, $J = 9.5$, 1H, H^3 -Chinolin), 4.15 (d, $J = 3.0$, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 1.32 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3421$ (m), 2976 (m), 2926 (m), 2853 (m), 2344 (w), 1684 (s), 1654 (s), 1636 (s), 1618 (s), 1560 (m), 1543 (w), 1508 (w), 1474 (w), 1430 (m), 1388 (m), 1365 (m), 1308 (m), 1258 (w), 1238 (w), 1155 (m), 1125 (w), 1050 (w), 966 (w), 942 (w), 828 (w), 789 (w), 713 (w), 670 (w), 612 (w)

$[\text{M}+\text{H}^+]$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$) $^-$ berechnet = 317.12; MS (ESI) m/z (%) = 317.0 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$

8.8 Darstellung von N-(2-Aminoethyl)glycin (**71**)^[60]



50 mL Ethylendiamin **9** (0.746 mol, 10 Äquiv.) wurde unter Rühren bei 4 °C portionsweise mit 7.09 g Chloressigsäure **104** (0.075 mol 1 Äquiv.) versetzt. Es wurde für weitere 12 Stunden bei RT weitergerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz eingengt. Das gewonnene Öl wurde mit 120 mL DMSO behandelt, wobei über einen Zeitraum von 4 Tagen kleine Kristalle ausgefallen waren. Die gewonnenen Kristalle wurden abgesaugt, mit DMSO gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die Mutterlauge wurde zu weiteren Kristallbildungen im Kühlschrank gelagert.

Ausbeute: 3.84 g (43.3%)

$R_f = 0.5$ (EtOAc/MeOH 1:1)

Smp.: 145-146 °C (Literatur^[60]: 152-153 °C)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): $\delta = 3.21$ (s, 2H, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$), 2.97 (q, $J = 5.8$, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 2.84 (q, $J = 5.8$, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$)

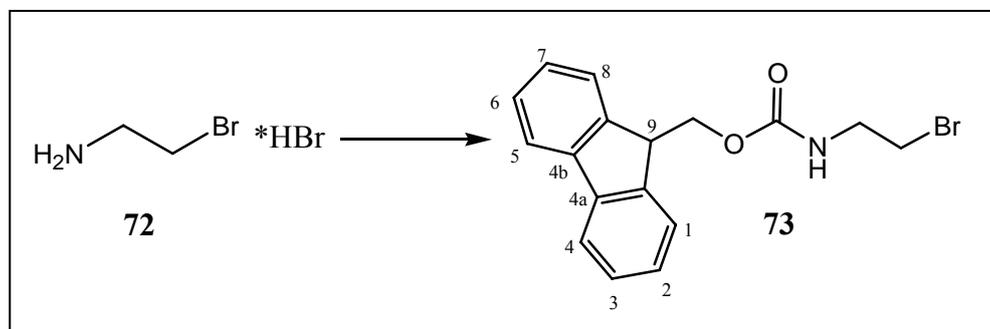
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3292 (s), 2934 (s), 2173 (s), 1932 (m), 1667 (s), 1600 (s), 1533 (s), 1483 (s), 1468 (s), 1458 (s), 1414 (s), 1365 (s), 1305 (s), 1241 (s), 1189 (s), 1128 (s), 1085 (s), 1058 (s), 1022 (s), 985 (s), 934 (s), 891 (s), 854 (s), 831 (s), 698 (s), 600 (m), 568 (s)

Elementaranalyse (%) für $C_4H_{10}N_2O_2$ (118.13):

berechnet: C 40.67 H 8.53 N 23.71

gefunden: C 40.66 H 8.32 N 23.47

8.9 Darstellung von 2-(Brom-ethyl)-carbamidsäure-9H-fluoren-9-yl-methylester (73)



Zu einer Lösung von 1.44 g 2-Brom-ethylamin-hydrobromid **72** (7.03 mmol, 1 Äquiv.) und 1 mL Triethylamin (7.03 mmol, 1 Äquiv.) in 15 mL absolutem DCM wurden unter Argon-Atmosphäre portionsweise 2 g 9-Fluorenylmethyl-N-chloroformat (7.73 mmol, 1.1 Äquiv.) zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde sauer ausgeschüttelt und die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet. Die säulenchromatographische Aufreinigung zu einem farblosen Feststoff erfolgte mit folgendem Laufmittelgradienten: Hexan/EtOAc (5:1 \rightarrow 3:1).

Ausbeute: 2.18 g (90%)

R_f = 0.56 (Hex/EtOAc 3:1)

Smp.: 126–128 °C

1H -NMR (250 MHz, DMSO): δ = 7.92 – 7.89 (m, 2H, $H^{4,5}$ -Fluoren-9-yl), 7.85 – 7.60 (m, 3H, $H^{1,8}$ -Fluoren-9-yl/-NH-), 7.45 – 7.28 (m, 4H, $H^{3,6,2,7}$ -Fluoren-9-yl), 4.34 (d, J = 6.5, 2H, Fluorenyl- CH_2), 4.26 – 4.21 (t, J = 6.5, 1H, H^9 -Fluoren-9-yl), 3.36 (m, 4H, -NH- CH_2 - CH_2 -Br)

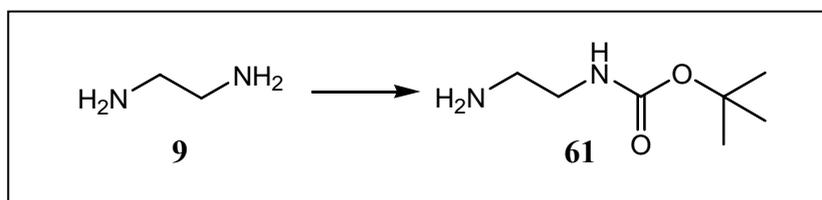
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3336 (m), 3062 (w), 3038 (w), 2956 (w), 2881 (w), 2343 (w), 1948 (w), 1910 (w), 1798 (w), 1692 (m), 1532 (m), 1475 (w), 1446 (w), 1357 (w), 1262 (m), 1214 (m), 1176 (m), 1147 (m), 1102 (w), 1082 (w), 1025 (w), 987 (w), 797 (w), 776 (w), 758 (m), 743 (m), 642 (w), 586 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₁₆NO₂ (266.31):

berechnet: C 58.97 H 4.66 N 4.06

gefunden: C 58.86 H 4.72 N 4.30

8.10 Darstellung von N-(2-Aminoethyl)-carbamidsäure-*tert*-butylester (61)^[66]



Eine Lösung von 28 mL 1,2-Ethylendiamin **9** (0.4 mol, 10 Äquiv.) in 400 mL Chloroform wurde in einem 1000 mL Dreihalskolben vorgelegt. Bei 0 °C wurde darauf eine Lösung von 8.72 g Di-*tert*-butyldicarbonat (0.04 mol, 1 Äquiv.) in 200 mL Chloroform zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz 24 Stunden bei RT gerührt. Danach wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (6 x 100 mL) und 100 mL Wasser gewaschen. Zur Gewinnung des farblosen Öls wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt.

Ausbeute 6.40g (100%)

R_f = 0.35 (EtOAc/MeOH 9:1)

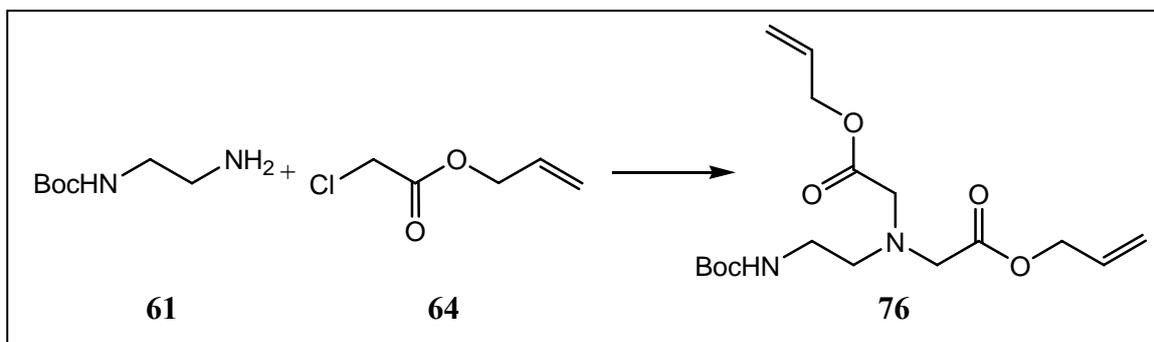
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 5.04 (bst, 1H, -NH-), 3.20 (q, J = 5.7, 2H, -NH-CH₂-), 2.83 (t, J = 5.7, 2H, -CH₂-NH₂), 2.09 (s, 2H, -NH₂), 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3363 (s), 2976 (m), 2932 (m), 2869(s), 2284 (s), 1785 (s), 1698 (m), 1524 (m), 1454 (w), 1391 (w), 1365 (w), 1251 (m), 1173 (m), 1102 (s), 1042 (m), 955 (m), 919 (m), 874 (m), 782 (w), 757 (w), 665 (s), 491 (s), 460 (s), 427 (s), 416 (s)

Elementaranalyse (%) für C₇H₁₆N₂O₂ x 0.25 Äquiv. H₂O (160.21):

berechnet:	C 51.04	H 10.10	N 17.01
gefunden:	C 51.34	H 10.00	N 16.71

8.11 Darstellung von N-(2-[*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl]nitrilodiessigsäureallylester (76)^[65]



10.8 mL N-Ethyldiisopropylamin (8.15 g, 63 mmol, 3 Äquiv.) und 7.4 mL Allylchloroacetat (**64**) (8.51 g, 63 mmol, 3 Äquiv.) wurden in 15 mL Acetonitril gelöst. Dazu wurde eine Lösung von N-Boc-Ethyldiamin (**61**) (3.38 g, 21 mmol, 1 Äquiv.) in 50 ml Acetonitril bei 0 °C zugegeben. Die Lösung wurde bei RT für 163 Stunden gerührt.

Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz im Vakuum eingeengt und anschließend in EtOAc aufgelöst. Die Lösung wurde mit gesättigter NaCl-Lösung und destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexan/EtOAc 3:1) Es wurde ein farbloses Öl gewonnen.

Ausbeute 4.68 g (62%)

R_f = 0.41 (Hex/EtOAc 3:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 6.53 (bst, 1H, -NH-), 5.98 – 5.85 (m, 2H, =CH-), 5.35 – 5.20 (m, 4H, =CH₂), 4.57 (d, J = 5.5, 4H, -O-CH₂-), 3.58 (s, 4H, N-CH₂-); 2.98 (q, J = 6.2, 2H, -CH₂-NH), 2.70 (t, J = 6.2, 2H, N-CH₂-), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl)

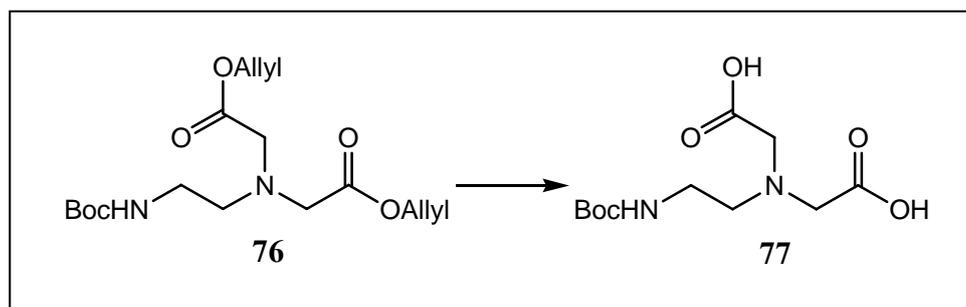
IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3409 (s), 2980 (s), 2937 (m), 1742 (s), 1712 (s), 1649 (m), 1509 (s), 1457 (m), 1414 (w), 1391 (m), 1366 (s), 1271 (s), 1250 (s), 1170 (s), 1082 (m), 988 (s), 932 (m), 862 (m), 780 (w), 760 (w), 559 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₂₈N₂O₆ (356.41):

berechnet: C 57.29 H 7.93 N 7.86

gefunden: C 57.09 H 8.06 N 7.94

8.12 Darstellung von N-(2-[*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl]nitrilodiessigsäure (77)



12.3 mL Phenylsilan (100 mmol, 4 Äquiv.) und 1.16 g Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (1 mmol, 0.04 Äquiv.) wurden unter Argon zu einer Lösung von 8.98 g Allylester (76) (25.19 mmol, 1 Äquiv.) in 90 mL absolutem THF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 24 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt, der Rückstand mit MeOH extrahiert und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (MeOH/EtOAc 9:1). Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus MeOH/Et₂O weiter aufgereinigt. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Niederschlag im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 4.71g (68%)

R_f = 0.34 (MeOH/EtOAc 9:1)

Smp.: 120-122 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = ~12 (bs, COOH), 6.64 (bst, 1H, -NH-), 3.43 (s, 4H, HOOC-CH₂-), 2.97 (t, J = 6.2, 2H, -CH₂-NH-), 2.67 (t, J = 6.2, 2H, >N-CH₂-), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3410 (s), 3353 (m), 3006 (w), 2977 (s), 2932 (m), 2615 (w), 2344 (w), 1704 (s), 1558 (w), 1513 (s), 1455 (w), 1436 (w), 1393 (m), 1366 (s), 1340 (w), 1274 (m), 1251 (s), 1174 (s), 1106 (w), 1086 (w), 1061 (w), 1040 (w), 1018 (w), 971 (w), 884 (m), 858 (m), 818 (w), 778 (w), 698 (w), 683 (w), 566 (w)

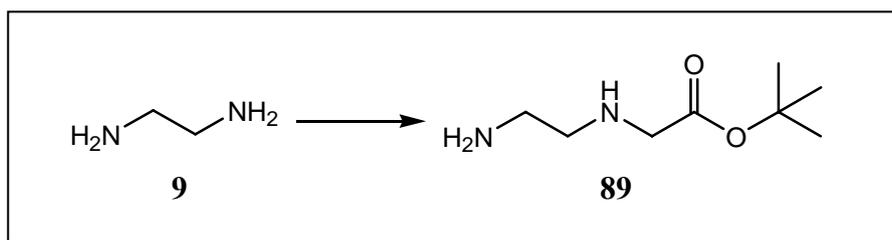
$[M-H^+]$ ($C_{11}H_{19}N_2O_6$)- berechnet = 275.13; MS (ESI) m/z (%) = 275.0 (100) $[M-H^+]$, 275.8 (13.05), 276.9 (2.05)

Elementaranalyse (%) für $C_{11}H_{20}N_2O_6 \times 0.25$ Äquiv. H_2O (276.28):

berechnet: C 47.05 H 7.36 N 9.98

gefunden: C 46.96 H 7.23 N 9.92

8.13 Darstellung von *tert*-Butyl N-(2-aminoethyl)-glycinat (**89**)^[73]



In einem 1000 mL Zweihalskolben wurden 50 mL Ethylendiamin (**9**) (0.75 mol, 10 Äquiv.) in 300 mL absolutem DCM vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von vier Stunden wurde eine Lösung von 13.8 mL *tert*-Butylbromacetat (0.085 mol, 1 Äquiv.) in 67 mL absolutem DCM zugetropft. Nach weiteren zwei Stunden wurde die Reaktionslösung langsam auf RT gebracht und anschließend nochmals über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit destilliertem Wasser gewaschen (3 x 80 mL) und die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 100 mL DCM rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft, wobei ein farbloses Öl gewonnen wurde.

Ausbeute 9.49 g (64 %)

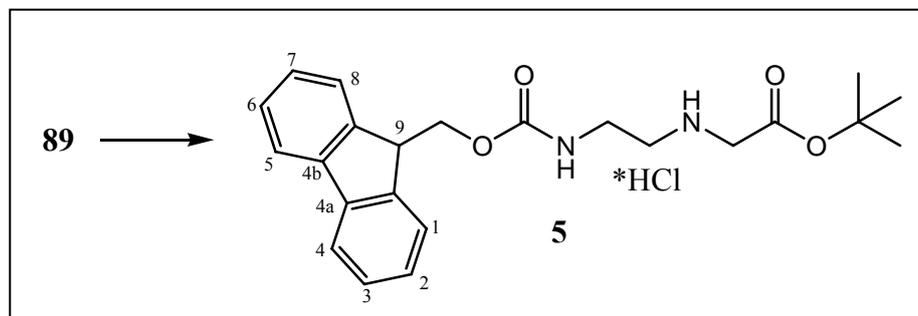
1H -NMR (250 MHz, DMSO): δ = 3.20 (s, 2H, CH_2 -COO-), 2.57 (t, J = 5.5, 2H, N- CH_2 -), 2.46 (t, J = 5.5, 2H, - CH_2 -NH), 1.42 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3085 (s), 3009 (m), 2987 (s), 1768 (s), 1705 (s), 1631 (m), 1546 (m), 1520 (m), 1460 (m), 1276 (w), 1203 (m), 1079 (m), 1046 (m), 987 (w), 830 (w), 680 (w), 597 (w)

$[M+H^+]$ ($C_8H_{19}N_2O_2$)⁺ berechnet = 175.13; MS [MALDI(+)] m/z (%) = 174.89 (28) $[M+H^+]$

$[M-H^+]$ ($C_8H_{17}N_2O_2$)⁻ berechnet = 173.13; MS [MALDI(-)] m/z (%) = 172.69 (75) $[M-H^+]$

8.14 Darstellung von *tert*-Butyl N-[2-(N-9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-glycinat Hydrochlorid (**5**)^[73]



Eine Lösung von 5 g Fmoc-Succinimid (14.8 mmol, 1 Äquiv.) in 80 mL DCM wurde zu einer Lösung von 2.58 g des *tert*-Butylester (**89**) (14.8 mmol, 1 Äquiv.) und 2.5 mL N-Ethyldiisopropylamin (14.8 mmol, 1 Äquiv.) in 180 mL DCM bei RT über einen Zeitraum von einer Stunde zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend mit 1N HCl (5 x 100 mL) und 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und anschließend bis etwa 50 mL eingengt. Eine Lagerung der eingengten Phase bei -20 °C führte zum Ausfall des Rohproduktes, das abfiltriert, mit kaltem DCM gewaschen und am Trockenstand getrocknet wurde. Umkristallisation mit Petrolether/EtOAc führte zum Reinprodukt.

Ausbeute 4.2 g (65.7 %)

R_f = 0.61 (EtOAc/MeOH 9:1)

Smp.: 97–99 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 9.13 (s, 2H, -NH₂⁺-), 7.90 (d, J = 7.5, 2H, H^{1,8}-Fluoren-9-yl), 7.70 (d, J = 7.5, 2H, H^{4,5}-Fluoren-9-yl), 7.52 – 7.32 (m, 5H, H^{2,3,6,7}-Fluoren-9-yl, -NH-), 4.35 (d, J = 6.5, 2H, -CH₂-O-), 4.25 (t, J = 6.5, 1H, -CH<), 3.89 (s, 2H, NH-CH₂-), 3.31 (q, J = 5.7, 2H, NH-CH₂-), 2.99 (t, J = 5.7, 2H, CH₂-NH), 1.47 (s, 9H, *tert*-Butyl)

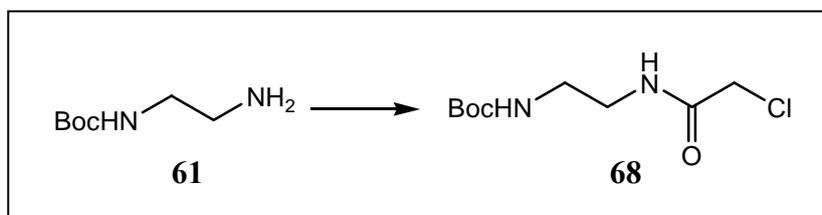
IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3396 (s), 3050 (s), 2992 (s), 2947 (s), 2721 (s), 2626 (s), 2372 (m), 1949 (w), 1912 (w), 1870 (w), 1749 (s), 1712 (s), 1526 (s), 1477 (s), 1476 (s), 1449 (s), 1405 (s), 1368 (s), 1348 (s), 1279 (s), 1244 (s), 1162 (s), 1080 (s), 1061 (s), 1034 (s), 988 (m), 896 (m), 841 (m), 759 (s), 739 (s), 701 (m), 621 (w), 598 (w), 561 (m)

Elementaranalyse (%) für $C_{23}H_{29}N_2O_4Cl$ (432.94):

berechnet: C 63.81 H 6.75 N 6.47

gefunden: C 63.56 H 6.94 N 6.36

8.15 Darstellung von [2-(2-Chloro-acetylamino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butylester (68)



Eine Lösung von 1.7 g N-Boc-ethylenediamin (**61**) (10 mmol, 1 Äquiv.) und 2.08 mL Triethylamin (15 mmol, 1.5 Äquiv.) in 50 mL Toluol wurde tropfenweise zu einer Lösung von 0.84 mL Chloressigsäuremethylester (9.55 mmol, 0.9 Äquiv.) in 50 mL Toluol bei 0 °C zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion auf RT gebracht. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Reaktionslösung unter Rückflusskühlung für 6 Stunden auf 80 °C erhitzt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel abgezogen und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Hexan 5:1). Man erhielt ein gelbes Öl von (**68**).

Ausbeute 1.57 g (66 %)

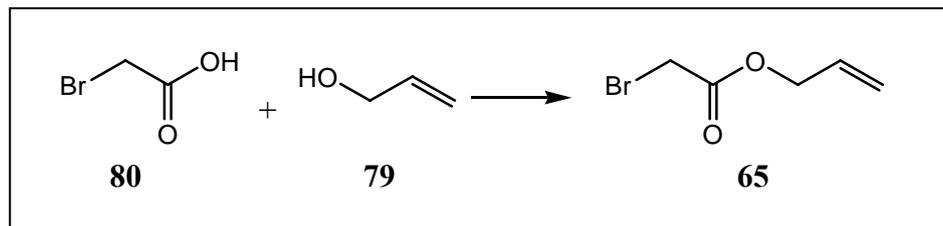
$R_f = 0.2$ (EtOAc/Hexan 5:1)

1H -NMR (250 MHz, DMSO): $\delta = 8.21$ (bs, 1H, OOC-NH-), 6.84 (bst, 1H, -NH-CO-), 4.05 (s, 2H, CO-CH₂-Cl) 3.11 (m, 2H, -NH-CH₂-), 3.02 (m, 2H, CH₂-NH-), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3359$ (s), 2984 (s), 1693 (s), 1650 (s), 1530 (s), 1446 (s), 1412 (s), 1389 (s), 1367 (s), 1321 (s), 1280 (s), 1232 (s), 1175 (s), 1079 (w), 1041 (w), 979 (s), 929 (w), 916 (w), 870 (m), 782 (w), 759 (s), 714 (m), 632 (m), 583 (m), 547 (w), 454 (w), 425 (w)

$[M+H^+]$ ($C_9H_{18}N_2O_3Cl$)⁺ berechnet = 237.09 MS (ESI) m/z (%) = 237.1 (69.4) $[M+H^+]$

Zersetzungsprodukt ohne Boc-Schutzgruppe: $[M+H^+]$ ($C_4H_{10}N_2OCl$)⁺ berechnet = 137.04 MS (ESI) m/z (%) = 136.4 (74.6) $[M+H^+]$, 137.0 (56.5)

8.16 Darstellung von Allylbromacetat (**65**)^[67]

In einem 250 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer wurden 50 mL Allylalkohol (**79**) (732 mmol, 1 Äquiv.) und 101.7 g Bromessigsäure (**80**) (732 mmol, 1 Äquiv.) unter Zugabe von einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure verestert, indem das Reaktionsgemisch auf 100 °C unter Rückfluss drei Stunden erhitzt wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit verdünnter NaOH-Lösung und destilliertem Wasser gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Produkt durch eine Vakuumdestillation gewonnen.

Ausbeute 62.7g (48 %)

Sdp.: 78 °C (16 Torr)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 6.01 – 5.86 (m, 1H, -CH=), 5.41 – 5.23 (m, 2H, =CH₂), 4.66 – 4.63 (m, 2H, -O-CH₂-), 4.20 (s, 2H, -CH₂-Br)

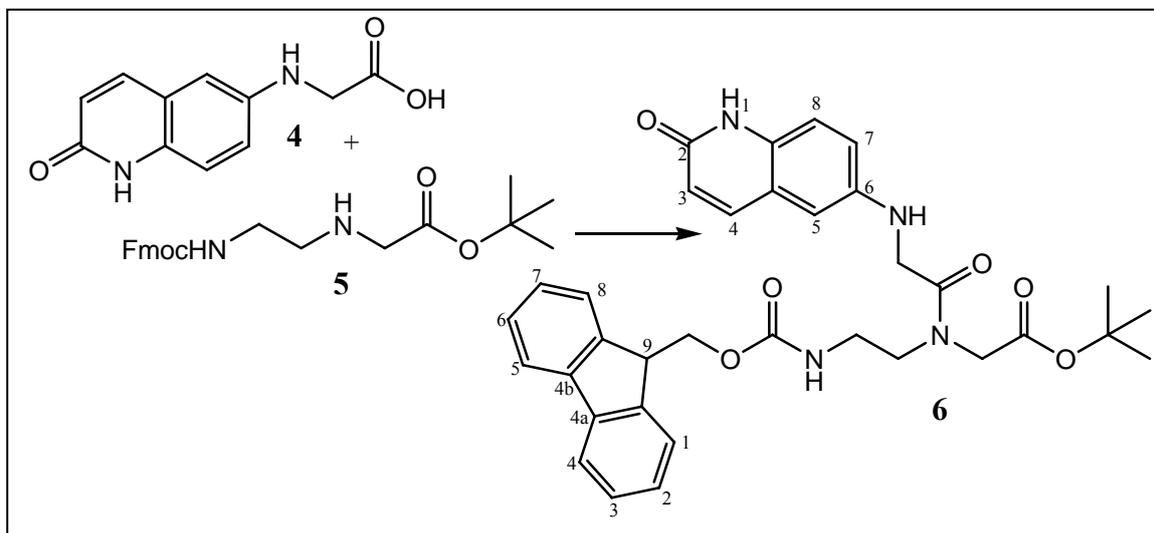
IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3089 (s), 3015 (s), 2938 (s), 1758 (w), 1631 (m), 1457 (m), 1412 (m), 1280 (w), 1179 (m), 1100 (m), 997 (m), 931 (m), 680 (s)

Elementaranalyse (%) für C₅H₇O₂Br (179.00):

berechnet: C 33.55 H 3.95

gefunden: C 33.47 H 3.89

8.17 Darstellung von {[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl] [2-(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylamino)-acetyl]-amino}-essigsäure tert-butylester (6)



In einen 250 mL Einhalskolben wurden 1.14 g Glycinat (**5**) (2.64 mmol, 1.1 Äquiv.) und 700 mg Carbonsäure (**4**) (2.4 mmol, 1 Äquiv.) mit 1.23 mL N-Ethyl-diisopropylamin (7.2 mmol, 3 Äquiv.) in 70 mL DMF vorgelegt. Dem Reaktionsgemisch wurden innerhalb von 30 Minuten zweimal 550 μ l DIC (7.2 mmol, 3 Äquiv.) und 550 mg HOBt (7.2 mmol, 3 Äquiv.) zugegeben. Anschließend wurde über Nacht bei RT gerührt. Zur vollständigen Umsetzung wurde die Reaktionslösung über drei Stunden bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und eingengt. Das gewonnene dunkelrote Öl wurde mittels Säulenchromatographie (Gradient: EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 9:1) aufgereinigt. Zur Abtrennung der Nebenprodukte wurde eine Aufreinigung per HPLC angeschlossen (RPC18AQ, H_3O^+ /CH₃CN 43:57). Es wurde ein gelblicher Feststoff gewonnen.

Ausbeute: 37 mg (9 %)

R_f = 0.55 (MeOH/EtOAc 1:9)

Smp.: 144–145 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO): δ = 11.47 (s, 1H, -NH-), 7.84 (d, J = 7.5, 2H, $H^{4,5}$ -Fluoren-9-yl), 7.64 (d, J = 9.5, 1H, H^4 -Chinolin), 7.59 (d, J = 7.5, 1H, $H^{1,8}$ -Fluoren-9-yl), 7.55 – 7.33 (m, 4H, $H^{2,3,6,7}$ -Fluoren-9-yl), 7.25 (t, J = 6.2, 1H, H^8 -Chinolin), 7.12 (d, J = 6.2, 1H H^7 -Chinolin), 6.92 (s, 1H, H^5 -Chinolin), 6.42 (d, J = 9.5, 1H, H^3 -Chinolin), 4.49 (t, J = 6.2, 1H, -CH<), 4.43

(d, $J = 6.2$, 2H, -O-CH₂-), 4.12 (s, 2H, -OOC-CH₂-N), 3.87 (s, 2H, OC-CH₂-NH), 3.50 – 3.33 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-NH), 1.40 (s, 9H, *tert*-Butyl)

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3448$ (s), 2981 (w), 2364 (w), 2344 (w), 1740 (m), 1718 (m), 1700 (m), 1670 (m), 1654 (s), 1648 (m), 1636 (w), 1625 (w), 1609 (w), 1570 (w), 1560 (w), 1542 (w), 1534 (w), 1522 (w), 1508 (w), 1497 (w), 1490 (w), 1474 (w), 1466 (w), 1458 (w), 1450 (w), 1430 (w), 1420 (w), 1406 (w), 1388 (w), 1364 (w), 1317 (w), 1301 (w), 1229 (w), 1188 (w), 1159 (w), 1124 (w), 956 (w), 756 (w), 671 (w), 579 (w)

[M+H⁺] (C₃₄H₃₇N₄O₆)⁺ berechnet = 597,3; MS [MALDI(+)] m/z (%) = 595.8 (100) [M+H⁺], 596 (96), 597 (66)

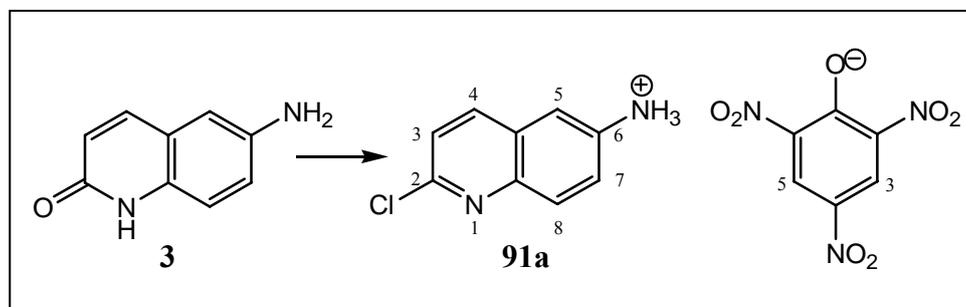
Elementaranalyse (%) für C₃₄H₃₆N₄O₆ (596.67) x 0.5 TFA, x 0.5 H₂O:

berechnet: C 63.43 H 5.70 N 8.45

gefunden: C 63.55 H 5.67 N 8.71

8.18 Darstellung von 6-Amino-2-chloro-chinolin (91)

Darstellung von 6-Amino-2-chloro-chinolin Pikrat (91a)



0.51 g des Chinolin (**3**) (3.2 mmol, 1 Äquiv.) wurden in 15 mL POCl₃ für drei Stunden refluxiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und zur Aufarbeitung auf gestoßenes Eis gegeben und mit 6 N-Natronlauge auf pH 9 eingestellt. Die wässrige Lösung engte man bis zur Trockne ein und extrahierte den Rückstand mit siedendem Methanol. Das Extrakt wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der verbleibende Feststoff wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (MeOH/EtOAc 1:9 + NH₃). Man erhielt 270 mg des Chinolin (**3**) (Rohausbeute: 47 %). Analysenrein wurde (**91**) durch Kristallisation des Pikrats (**91a**) gewonnen.

Ausbeute: 190 mg (15 %)

$R_f = 0.86$ (MeOH/EtOAc 1:9)

Smp.: 163 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 8.60$ (s, 2H, $H^{3,5}$ -Pikrat), 8.27 (d, $J = 8.5$, 1H, H^4 -Chinolin), 7.84 (d, $J = 9.0$, 1H, H^8 -Chinolin), 7.48 (d, $J = 8.5$, 1H, H^3 -Chinolin), 7.43 (t, $J = 2.25/9.0$, 1H, H^7 -Chinolin), 7.35 (d, $J = 2.25$, 1H, H^5 -Chinolin), 5.02 – 4.69 (bs, 3H, $-\text{NH}_3^+$)

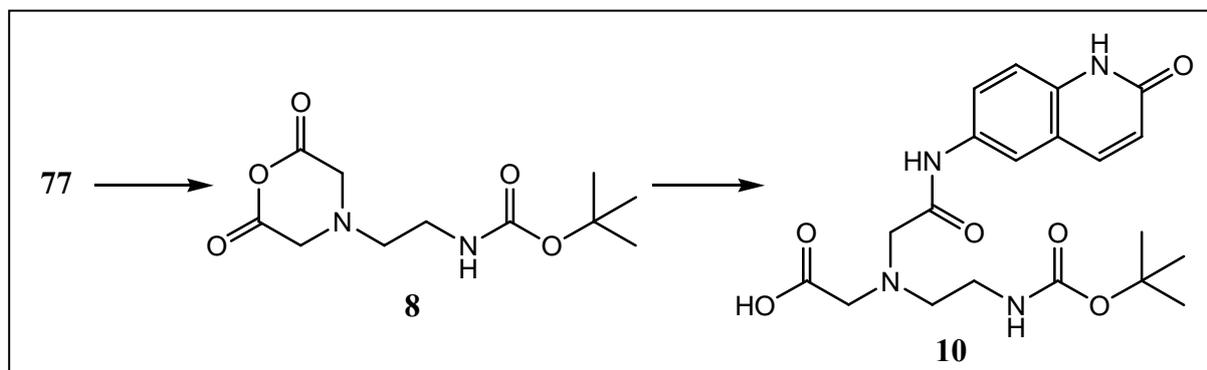
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3588$ (w), 3423 (m), 3099 (m), 2856 (m), 2362 (m), 2344 (m), 1734 (w), 1718 (w), 1615 (s), 1572 (s), 1533 (s), 1504 (s), 1427 (m), 1364 (s), 1334 (s), 1299 (s), 1275 (s), 1227 (m), 1165 (m), 1149 (m), 1101 (m), 1082 (m), 1002 (m), 942 (w), 917 (m), 824 (m), 789 (m), 743 (m), 715 (m), 670 (w), 661 (w)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_7\text{Cl}$ (407.73):

berechnet: C 44.19 H 2.47 N 17.18

gefunden: C 43.95 H 2.76 N 16.97

8.19 Darstellung von N-{(2-[*tert*-Butoxycarbonylamino]ethyl)-[(2-oxo-1,2-dihydrochinolin-6-ylcarbamoyl)-methyl]-nitrilo}-essigsäure (10)



In einem 250 mL Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer wurde 1 g der Dicarbonsäure (77) (3.62 mmol, 1 Äquiv.) unter Argon-Atmosphäre in 30 mL absolutem Pyridin gelöst. Anschließend wurden 0.68 mL Essigsäureanhydrid (7.24 mmol, 2 Äquiv.) über ein Septum zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 Stunden bei 65 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der Dicarbonsäure (77) zum Anhydrid (8) wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und mit 0.58 g des Chinolin (3) (3.62 mmol, 1 Äquiv.) versetzt und für weitere 24 Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen und das Produkt durch Säulenchromatographie (Gradient: EtOAc/MeOH 9:1 → EtOAc/MeOH 1:1) zu einem gelblichen Feststoff aufgeeignet.

Ausbeute: 497 mg (33 %)

$R_f = 0.21$ (MeOH/EtOAc 1:9)

Smp.: 121-124 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO): $\delta = 12.28$ (s, 1H, *exo*-NH), 11.73 (s, 1H, Chinolin-NH), 8.14 (s, 1H, H^5 -Chinolin), 7.84 (d, $J = 9.5$, 1H, H^4 -Chinolin), 7.81 (t, $J = 8.5$, 1H, H^7 -Chinolin), 7.29 (d, $J = 8.5$, 1H, H^8 -Chinolin), 7.16 (s, 1H, Boc-NH), 6.47 (d, $J = 9.5$, 1H, H^3 -Chinolin), 3.18 (s, 2H, HOOC- CH_2 -N<), 3.08 (s, 2H, >N- CH_2 -CO-), 2.93 (q, $J = 5.5$, 2H, - CH_2 -NH), 2.70 (t, $J = 5.5$, 2H, >N- CH_2 -), 1.26 (s, 9H, *tert*-Butyl)

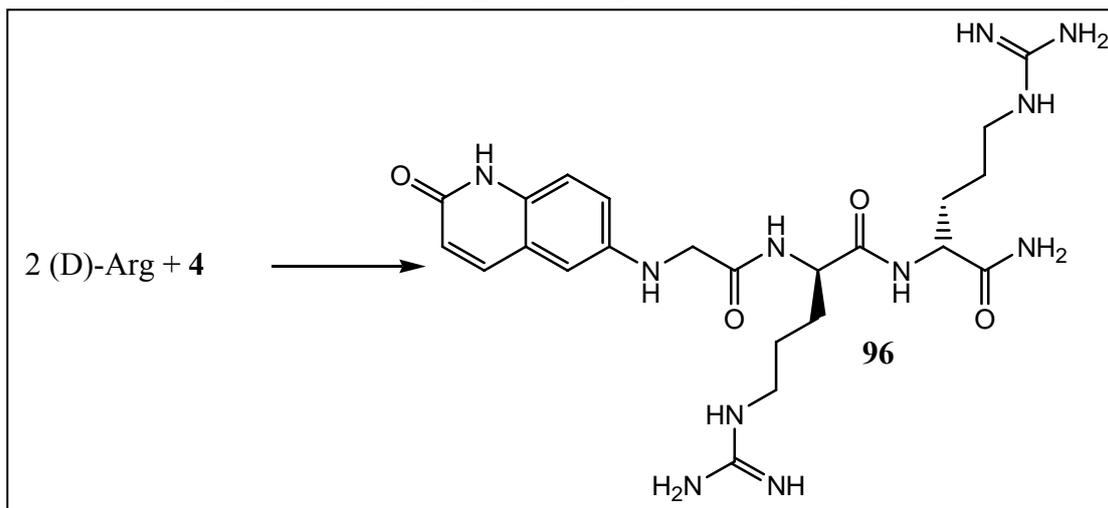
IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3392$ (s), 2978 (s), 2344 (w), 1689 (s), 1654 (s), 1611 (s), 1578 (s), 1508 (m), 1450 (m), 1424 (s), 1394 (m), 1368 (s), 1280 (s), 1253 (s), 1168 (s), 1125 (m), 1024 (w), 968 (w), 888 (m), 830 (m), 782 (w), 690 (w), 621 (w), 598 (w), 560 (w)

$[M+H^+]$ ($C_{20}H_{27}N_4O_6$)⁺ berechnet = 419.19; MS [ESI] m/z (%) = 419.2 (49.1) $[M+H^+]$, 420.1 (10.9), 421.1 (1.7)

Zersetzungsprodukt ohne Boc-Schutzgruppe:

$[M+H^+]$ ($C_{15}H_{19}N_4O_4$)⁺ berechnet = 319.13; MS [ESI] m/z (%) = 319.0 (100) $[M+H^+]$, 320.1 (17.6), 320.9 (1.8)

8.20 Darstellung von (4)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (96)



154 mg trockenes Rink Amid MBHA Harz (0.12 mmol, 1 Äquiv.) wurden in einer Spritze mit DCM aufgequollen und anschließend auf das Lösungsmittel DMF umgestellt. Mit einer 25-%igen Piperidin in DMF-Lösung für 20 min. wurde das Fmoc-geschützte Harz entschützt. Nach der Abspaltung wurde das Harz mit DMF gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 239 mg Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH (0.362 mmol, 3 Äquiv.), 55 mg HOBt (0.362 mmol, 3 Äquiv.) und 56 µL DIC (0.362 mmol, 3 Äquiv.) in 2 mL DMF versetzt und für fünf Stunden geschüttelt. Nach negativem Kaiser-Test wurde der Reaktionsansatz mit DMF gewaschen und anschließend mit Piperidin (25 % in DMF) für 20 min. behandelt und mit DMF gewaschen. Nach der Abspaltung wurde das Harz mit DMF gewaschen und mit einer Lösung von 239 mg Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH (0.362 mmol, 3 Äquiv.), 55 mg HOBt (0.362 mmol, 3 Äquiv.) und 56 µL DIC (0.362 mmol, 3 Äquiv.) in 2 mL DMF versetzt und über Nacht geschüttelt. Nach negativem Kaiser-Test wurde der Reaktionsansatz mit DMF gewaschen und anschließend mit Piperidin (25 % in DMF) für 20 min. behandelt und mit DMF gewaschen. Der Reaktionsansatz wurde mit einer Lösung von 70 mg des Lactamessigsäurederivat (4) (0.241 mmol, 2 Äquiv.), 40 mg HOBt (0.241 mmol, 2 Äquiv.) und 40 µL DIC (0.241 mmol, 3 Äquiv.) in 2 mL DMF versetzt und über Nacht geschüttelt. Nach negativem Kaiser-Test wurde der Ansatz mit DMF gewaschen und dann mit DCM nachgewaschen.

Für die Abspaltung vom Harz und die Abspaltung der Schutzgruppen am Arginin wurde das Harz getrocknet und anschließend mit einer Lösung aus TFA (1650 μL), Thioanisol (100 μL), H_2O (100 μL), Phenol (50 mg) und EDT (50 μL) für fünf Stunden behandelt. Die Abspatlösung wurde in eisgekühlten Ether gegeben, wobei das Tripeptid (**96**) als weißer Feststoff ausfiel. Der Reaktionsansatz wurde für fünf Minuten mit TFA (1000 μL) nachgespült, wobei die Spüllösung ebenfalls im eisgekühlten Ether als Feststoff ausfiel. Die Peptidfällung wurde über Nacht bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ vervollständigt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und einige Male mit Ether nachgewaschen. Nach dem Verdampfen des restlichen Ethers wurde das Pellet in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und in ein Eppendorf-Cap überführt. Das Lösungsmittel wurde über die Speed-Vac abgezogen. Man erhielt (4)-(D)Arg-(D)-Arg-CO-NH₂ (**96**) mit einer Rohausbeute von 7 % nach Aufreinigung per HPLC.

$\text{M} (\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_{11}\text{O}_4\text{Na})^+$ berechnet = 552.28; MS [MALDI] m/z (%) = 553.74 (100) [M+H⁺]

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Äquiv.	Äquivalente
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Cbz	Carboxybenzoxy
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BOP	Benzotriazolyl-1-oxytris(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat
DBAD	Di- <i>tert</i> -butylazodicarboxylat
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCB	Dichlorbenzol
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMA	Dimethylacetamid
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
2-DOS	2,9-Dimethylphenanthrolin
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
ESI-MS	Elektrosprayionisationsmassenspektroskopie
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPPS	Festphasenpeptidsynthese
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
Hex	Hexan

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IC ₅₀	half inhibition concentration
IR	Infrarot
LTR	long terminal repeat
NA	Nucleinsäure
NEM	N-Ethylmorpholin
NMP	Methylpyrrolidon
NMR	Nuclearmagnetische Resonanz
NPE	(4-Nitrophenyl)ethyl
Mmt	4-Methoxyphenyldiphenylmethyl
MTD	Membrane Transduktionspeptid
PBS	Primer binding site
PNA	Polyamid (Peptid) Nucleinsäure
PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxytrispyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
RNA	Ribonucleinsäure
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
Suc	Succinimid
TAR	<i>Trans</i> -Activation Responsive
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOTU	O-[(Cyano(ethoxycarbonyl)methylen)amino]-1,1,3,3- tetramethyluronium Tetrafluoroborat
UV	Ultraviolett

9.2 Literaturverzeichnis

- [1] T. Hermann, *Biopolymers* **2003**, *70*, 4-18
- [2] C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1489-1513
- [3] N. Kaushik, A. Basu, P. Palumbo, R. L. Myers, V. N. Pandey, *J. Virology*, **2002** *76*(8), 3881-3891
- [4] P. N. Pandey, N. Kaushik, A. Basu, P. Palumbo, R. L. Myers, S. Bechan, *PCT Int. Appl.*, **2004**, 1-146
- [5] J. L. Battiste, R. Tan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 2741-2747
- [6] T. Mayhood, N. Kaushik, P.K. Pandey, F. Kashanchi, L. Deng, V. N. Pandey, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 11532-11539
- [7] S. E. Davis, B. S. Rauckman, J. H. Chan, B. Roth, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 1936-1942
- [8] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2796-2823
- [9] P.E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500
- [10] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1996**, *4*, 5-23
- [11] M. J. Lutz, S. A. Benner, S. Hein, G. Breipohl, E. Uhlmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3177-3178
- [12] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 6179-6194
- [13] D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdlov, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 3571-3574
- [14] G. Breipohl, D. W. Will, A. Peyman, E. Uhlmann, *Tetrahedron* , **1997**, *53*, 14671-14686
- [15] L. Kosynkina, W. Wang, T. C. Liang, *Tetrahedron Letters*, **1994**, *35*(29), 5173-5176
- [16] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchard, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 5767-5773
- [17] G. Breipohl, D. W. Will, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis*, **1996**, 61-64
- [18] A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Kuyl-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Cim. Pays-Bas*, **1995**, *114*, 295-297

- [19] P. J. Finn, N. J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 3357-3363
- [20] A. Peyman, E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, G. Breipohl, D. W. Will, A. Schaefer, H. Wallmeier, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 2797-2800
- [21] B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 1083-1088
- [22] T. Govindaraju, V. A. Kumar, K. N. Ganesh, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*(6), 1858-1865
- [23] L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Engholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R.H. Berg, *J. Pept. Sci.*, **1995**, *1*, 175-183
- [24] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 1895-1897
- [25] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, *4*, 5-23
- [26] D. J. Rose *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 3545-3549
- [27] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, A. Graeslund, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5544-5552
- [28] M. Engholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 283-284
- [29] P. E. Niesen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 197-200
- [30] V.V. Demidov, D. I. Cherny, A. V. Kurakin, M. V. yavnilovich, V. A. Malkov, M. D. Frank-Kamenetskii, S. H. Soennichsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5218-5222
- [31] P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 7049-7054
- [32] N. J. Peffer, J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thoson, C. F. Hassman, S. A. Nobel, L. E. Babiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 10648-10652
- [33] L. Chiarantini, A. Cerasi, A. Fraternali, F. Andreoni, S. Scari, M. Giovine, E. Clavarino, M. Magnani, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 8471-8477
- [34] W. Mier, R. Eritja, A. Mohammed, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Angew. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1968-1971
- [35] M. Eriksson, P. E. Nielsen, L. Good, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*(9), 7144-7147
- [36] L. Mologni, P. leCoutre, P. E. Nielsen, C. Gambacorti-Passerini, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 1934-1938
- [37] A. Ray, B. Norden, *FASEB J.*, **2000**, *14*, 1041-1060

- [38] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Gene*, **1994**, *149*, 139-145
- [39] R. Lee, N. Kaushik, M. J. Modak, R. Vinayak, V. N. Pandey, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 900-910
- [40] M. J. Gait, J. Karn, *Trends Biochem. Sci.*, **1993**, *18*, 255-259
- [41] N. Kaushik, A. Basu, V. N. Pandey, *Antiviral Research*, **2002**, *56*(1), 13-27
- [42] C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1489-1513
- [43] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**
- [44] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1995**
- [45] A. Jack, J. E. Ladner, D. Rhodes, R. S. Brown, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **1977**, *111*(3), 315-328
- [46] M. Zhao, L. Ratmeyer, R.G. Peloquin, S. Yao, A. Kumar, J. Spsychala, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *3*, 785
- [47] A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 972-978
- [48] Y. Tor, *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 998-1007
- [49] B. Davis, M. Afshar, G. Varani, A.I. Murchie, J. Karn, G. Lentzen, M. Dysdale, J. Bower, A. J. Potter, I. D. Starey, T. Swarbrick, F. Aboul-ela, *J. Mol. Biol.*, **2004**, *336*(3), 343-356
- [50] L. Dassonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4487-4492
- [51] H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Troung, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1173-1184
- [52] F. Hamy, V. Brondani, A. Flörsheimer, W. Stark, M. J. J. Blommers, T. Klimkait, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 5086-5096
- [53] F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-Ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 3548-3553
- [54] I. Huq, Y. Ping, N. Tamilaraso, T. N. Rana, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5172-5177
- [55] *The RNA World*, 2. Aufl. (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**
- [56] S. Uderfriend, L. Gerber, N. Nelson, *Anal. Biochem.*, **1987**, *161*, 494-500
- [57] T. E. Edwards, S. Th. Sigurdson, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 14843-14847
- [58] C. Matsomoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1857-1861

- [59] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 4. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, **2002**
- [60] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, **2000**
- [61] E. E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, (13) 539-540
- [62] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85(14), 2149-2154
- [63] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 1. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**
- [64] E. P. Heimer, H. E. Gallo-Torres, A. M. Felix, M. Ahmad, T. J. Lambros, F. Scheidl, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1984**, 23, 203-211
- [65] J. W. Lee, J.Y. Lu, P. S. Low, P.L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 2397-2414
- [66] A. Eisenführ, P. S. Arora, G. Sengle, L. R. Takaoko, J. S. Nowick, M. Famulok, *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 235-249
- [67] H. Th. Clarke, *J. Chem. Soc.*, **1910**, 97, 416-429
- [68] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2. Aufl., John Wiley & Sons, Inc. New York, 1991
- [69] J. R. A. Geigy, *Fr. Pat.*, **1969**, 1, 548 888
- [70] F. Fernández, X. García-Mera, M. Morales, J. E. Rodríguez-Borges, *Synthesis*, **2001**, 2, 239-242
- [71] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron*, **1995**, 51(22), 6179- 6194
- [72] Dissertation M. T. Heinel, Frankfurt a. M., **2003**
- [73] J. Bondebjerg, M. Grunnet, Th. Jespersen, M. Meldal, *ChemBioChem*, **2003**, 4, 186-194
- [74] Diplomarbeit T. Rothenbücher, Frankfurt a. M., **2003**
- [75] Diplomarbeit M. Suhartono, Frankfurt a. M., **2004**
- [76] A. Fürstner, D. De. Souza, L. Rarra-Rapado, J. T. Jenson, *Angew. Chem.*, **2003**, 115(43), 5516-5518; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, 42(43), 5358-5360
- [77] aus www.albany.edu/chemistry/cbb/

9.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den

.....
(Sven Thomas Breitung)